

UNIVERSITE DE SHERBROOKE

*Des autoanticorps humains reconnaissent des déterminants
conformationnels de la protéine Ro(SS-A)*

par

Sylvie Lapointe

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de maître ès Sciences (M. Sc.)

Janvier 1990



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-81884-0

Canada

TABLE DES MATIÈRES

Liste des illustrations.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Liste des abbréviations.....	vii
Résumé.....	ix
 1. INTRODUCTION	
1.1 Système immunitaire.....	1
1.1.1 Tolérance.....	2
1.1.1.1 Définition.....	2
1.1.1.2 Pré-requis.....	2
1.1.1.3 Mécanismes de la tolérance.....	6
1.1.2 Mécanismes de l'autoimmunité.....	7
1.1.3 Conséquences de l'autoimmunité.....	8
1.1.3.1 Autoantigènes et autoanticorps...	11
1.1.3.2 Maladies autoimmunes.....	11
1.1.3.3 Mécanismes immunopathologiques des maladies autoimmunes.....	17
1.2 Propriétés moléculaires des antigènes Ro(SS-A) et La(SS-B).....	20
1.2.1 Classification.....	20
1.2.2 Caractérisation de l'antigène Ro(SS-A)...	22
1.2.3 Caractérisation de l'antigène La(SS-B)...	37

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Préparation de l'antigène Ro(SS-A).....	43
2.2 Sérums de référence.....	44
2.3 Immunodiffusion double.....	47
2.4 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransfert.....	48
2.5 Immunoblot.....	50
2.6 Épuisement des anticorps dénaturés du polypeptide Ro(SS-A).....	51
2.7 Immunoprécipitation d'un extrait de cellules radiomarquées.....	52
2.8 Expérience d'électrophorèse par isofoca- lisation avec l'appareil Rotofor.....	54

3. RÉSULTATS

3.1 Détection des anticorps anti-Ro(SS-A) et anti-La(SS-B) par la technique d'immunoblot....	57
3.2 Quelques sérums reconnaissent le polypeptide Ro(SS-A) de 60 kD en condition native seulement.....	61
3.3 Comigration d'une portion des antigènes Ro(SS-A) et La(SS-B) en gel de polyacrylamide natif.....	70
3.4 Quelques sérums anti-Ro(SS-A) reconnaissent un déterminant antigénique présent seulement sur la protéine native Ro(SS-A) de 60 kD.....	77
3.5 Hétérogénéité du Ro(SS-A).....	77

4.	DISCUSSION.....	86
5.	CONCLUSION.....	94
6.	REMERCIEMENTS.....	95
7.	RÉFÉRENCES.....	96
8.	ANNEXE I.....	A-1
9.	ANNEXE II.....	A-3

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 :	Perte de la tolérance au soi.....	10
Figure 2 :	Immunoprécipitation de l'extrait de cellules HeLa humaines et d'un ascite de cellules de souris Ehrlich.....	28
Figure 3 :	Structure secondaire des ARN hY1, hY3 et hY5.....	31
Figure 4 :	Hypothèse de la co-existence de l'antigène Ro(SS-A) et La(SS-B) humaine, sur la même particule.....	40
Figure 5 :	Analyse des sérums "non bloteurs" anti-Ro(SS-A) et anti-La(SS-B).....	60
Figure 6 :	Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des méthodes d'immunodétection...	65
Figure 7 :	Immunoblot des lignes de précipitation obtenues par la technique d'immunodiffusion..	69
Figure 8 :	Immunoprécipitation d'un extrait de cellules HeLa marquées au ³² P.....	72
Figure 9 :	Immunoblots en gels natifs.....	76
Figure 10 :	Les sérums anti-Ro(SS-A) contiennent deux espèces d'anticorps anti-Ro(SS-A).....	79
Figure 11 :	Hétérogénéité de la protéine Ro(SS-A).....	83

TABLEAUX

Tableau 1 : Autoanticorps sériques retrouvés dans la maladie lupique.....	15
Tableau 2 : Particules de ribonucléoprotéines reconnues par les autoanticorps.....	24
Tableau 3 : Représentations schématiques de la technique de la préparation antigénique.....	46
Tableau 4 : Tableau comparatif des sérums positifs par les techniques d'immunodiffusion et d'immunoblot.....	63
Tableau 5 : Tableau comparatif des pH du fraction- nement et du refractionnement de Ro(SS-A) et La(SS-B) de rate humaine, par isoélectrofocalisation.....	85

LISTE DES ABREVIATIONS

AAN :	Anticorps antinucléaire
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
BSA :	Sérum albumine bovine
CDC :	Centre de contrôle des maladies (Atlanta-Ga)
DEAE-cellulose :	Diéthylaminoéthyl cellulose
DTT :	Dithiothréitol
IB :	Immunoblot
ID :	Immunodiffusion
Ig :	Immunoglobuline
IPP :	Immunoprécipitation
kD :	Kilo dalton
LED :	Lupus érythémateux disséminé
mM :	Millimolaire
MHC :	Complexe majeur d'histocompatibilité
N-PAGE :	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition native.
PBS :	Tampon phosphate salin
pI :	Point isoélectrique
PMSF :	Fluorure de phényl, méthyl, sulfonyle
PR :	Polyarthrite rhumatoïde
RNP :	Ribonucléoprotéine
SAS :	Sulfate d'ammonium saturé
SDS :	Dodécylsulfate de sodium

SS :	Syndrome de Sjogren
ScRNA :	Small cytoplasmic RNA
ScRNP :	Small cytoplasmic ribonucleoproteins
SnRNA :	Small nuclear RNA
SnRNP :	Small nuclear ribonucleoproteins
TBS :	Tampon Tris salin
TcR :	Récepteur des cellules T
Th :	Cellule T helper
Ts :	Cellule T suppressive
uCi :	Microcurie

*Des autoanticorps humains reconnaissent des déterminants
conformationnels de la protéine Ro(SS-A).*

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de
l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.).

Résumé

L'information concernant la structure et les fonctions biologiques des antigènes, ciblés par les anticorps peuvent fournir un aperçu de l'étiologie et de la pathogénèse. Nous avons développé une technique d'immunoblot spécifique et sensible pour la détection de l'anticorps anti-Ro(SS-A), utilisant des extraits de rate humaine comme source d'antigène et des sérums de patients atteints de lupus érythémateux disséminé, de polyarthrite rhumatoïde et de syndrome de Sjögren comme source d'anticorps. La plupart des sérums positifs en immunodiffusion le sont aussi dans ce système. Quelques sérums positifs observés par la technique d'immunodiffusion ne reconnaissent pas la protéine Ro(SS-A) en immunoblot en condition électrophorétique dénaturante. Pour analyser ce phénomène, des lignes de précipitation obtenues en immunodiffusion avec ces sérums ont été coupées, lavées, éluées, soumises à l'électrophorèse sur gel polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium en condition non réductrice, et immunoblottées. Elles contiennent l'antigène

Ro(SS-A), suggérant que les lignes obtenues en immunodiffusion ne sont pas des faux-positifs. Ceci a été confirmé par la technique d'immunoprécipitation d'un extrait de cellules HeLa marquées au ^{32}P dans lesquelles les Y ARN associés au Ro(SS-A) ont été identifiés par autoradiogramme d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant de l'urée (7M). L'immunoblot de l'extrait de rate ayant migré sous des conditions natives a révélé la présence de l'antigène Ro(SS-A) libre (R_m 0,75) ainsi qu'associé avec l'antigène La(SS-B) (R_m 0,45). Ce dernier peut être dissocié par un prétraitement de l'extrait de rate humaine avec le 2-mercaptoéthanol. Ces résultats suggèrent que les immunoblots négatifs en gel dénaturant étaient des faux-négatifs. Donc quelques sérums reconnaissent spécifiquement l'antigène Ro(SS-A) natif mais ne le reconnaissent pas quand il est dénaturé. Après épuisement des anticorps dirigés contre le polypeptide Ro(SS-A) dénaturé de 60 kD, tous les sérums anti-Ro(SS-A) reconnaissent encore les déterminants conformationnels de Ro(SS-A). Le fait que certains sérums anti-Ro(SS-A) contiennent des anticorps dirigés contre l'antigène natif et dénaturé, alors que d'autres ne reconnaissent que les déterminants conformationnels suggèrent que la formation de ces anticorps pourrait être induite via une stimulation directe par l'antigène natif.

Dans ce mémoire R_0 , $R_0(SS-A)$ et $SS-A$ d'une part et La , $La(SS-B)$ et $SS-B$ d'autre part, sont utilisés de façon interchangeable.

1. INTRODUCTION

1.1 Système immunitaire

Notre environnement contient une grande variété de microorganismes qui peuvent être à l'origine de désordres pathologiques plus ou moins graves pour l'organisme qui les héberge, quand rien ne s'oppose à leur prolifération. Mais grâce au système immunitaire, l'homme et les animaux peuvent combattre les agents infectieux.

Le système immunitaire est essentiellement orienté vers le rejet des cellules et antigènes étrangers, bactéries, greffes, tumeurs ou de ses propres cellules modifiées par un virus. La plupart de ces réactions sont favorables à l'individu (hormis en général, le rejet de greffe) (Kahn et Peltier, 1982). La fonction majeure du système immunitaire serait donc de réagir contre des substances étrangères et non contre les propres constituants de l'organisme.

En effet, depuis 1900, le postulat de base en immunologie est que le système immunitaire ne réagit pas en temps normal contre les propres constituants de l'organisme. Ce phénomène, désigné originellement par Ehrlich comme "l'horror autotoxicus", est accepté aujourd'hui comme étant

l'autotolérance immunologique, capitale pour maintenir l'homéostasie (Théofilopoulos, 1987).

Il y a cependant des circonstances fréquentes où la sollicitation inappropriée d'un système immunitaire pourtant normal ou prédisposé peut entraîner une réaction dirigée contre les propres constituants de l'organisme. On parle alors d'autoimmunité. Cet état où la tolérance du soi est perdue se manifeste par la présence de cellules et d'anticorps autoréactifs dans un contexte de maladie (Bach et Lesaure, 1982).

1.1.1 Tolérance

1.1.1.1 Définition

La tolérance immunitaire peut être définie comme étant un état de non-réactivité spécifique du système immunitaire face à un antigène avec lequel il a eu un contact préalable.

1.1.1.2 Pré-requis immunologique

Nossal (1989) a publié récemment une excellente revue sur le mécanisme immunologique de la tolérance dont nous avons reproduit la traduction ci-après : "Pour comprendre la capacité du système immunitaire à distinguer

entre le " soi " et le " non-soi " , il faut se rappeler trois caractéristiques principales des réponses immunes".

"Premièrement, la reconnaissance immune dépend des **récepteurs spécifiques** des membranes des lymphocytes qui sont générés somatiquement (Talmage, 1957; Burnet, 1957) par des mécanismes de recombinaison de gènes. Chaque lymphocyte porte à sa surface un seul type de récepteur provenant d'une seule recombinaison des gènes spécifiques à la cellule (Nossal et Lederberg, 1958; Hozumi et Tonegawa, 1976; Yanagi et al, 1984; Hedrick, 1984)".

"Deuxièmement, les réponses immunes impliquent une **collaboration** entre deux types de lymphocytes : les cellules T du thymus et les cellules B de la moelle osseuse (Claman et al, 1966; Nossal et al, 1968). Les cellules T sont responsables de l'inflammation chronique et contrôlent les réponses immunes en sécrétant des lymphokines. Le récepteur des cellules T (TCR) reconnaît des fragments peptidiques issus ("process") d'antigènes complexes (Babbitt et al, 1985; Buus, 1986). Ces fragments sont liés fermement mais de façon non-covalente à une structure en forme de gouttière sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I (Bjorkman et al, 1987) ou II (Brown et al, 1988). Les cellules B sont responsables de la synthèse d'anticorps. Elles expriment à

la surface de leur membrane cellulaire des molécules IgM et IgD".

"Troisièmement, un antigène qui pénètre dans un organisme doit induire les lymphocytes spécifiques pour cet antigène à quitter l'état Go et entreprendre une série de mitoses. Ce processus qui donne lieu à l'apparition d'un clone différencié de cellules effectrices, soit des cellules T activées, des cellules T helper, des cellules tueuses ou des cellules B productrices d'anticorps, est le processus de sélection clonale. La cascade immunoproliférative n'est pas simplement induite par l'union d'un antigène avec un récepteur. Elle exige plutôt la réticulation ("cross-linking") de multiples récepteurs, un afflux de cytokines qui sont des facteurs de différenciation et de croissance et peut-être d'autres signaux particuliers de certains contacts intercellulaires (Zubler et al, 1987; Sanders et al, 1986). En raison de la complexité de l'activation clonale, la sensibilité d'une cellule à des signaux représente une variable majeure dans l'immunorégulation (Nossal, 1983)".

"Les populations de cellules T et B d'un adulte représentent des répertoires d'unités de reconnaissance faisant en sorte que la plupart des pathogènes suscitent des réponses de la part des deux groupes de cellules B et T. Des contraintes opèrent sur les deux systèmes de

reconnaissance. Concernant le système des cellules T, la plupart des protéines typiques ont seulement un ou deux peptides (d'environ 12 acides aminés de longueur) capables de s'associer convenablement avec les molécules MHC d'un individu. Donc, il existe une possibilité (rare dans les espèces non consanguines) de non-reconnaissance de la protéine et donc de non-réponse déterminée génétiquement si aucun de ces peptides (appelé épitope à cellules T) ne s'adapte aux différentes structures codées par les gènes MHC de l'individu. Concernant les cellules B, la grande variation dans les constantes d'affinité des anticorps montre clairement que la reconnaissance immunologique est une question de degré, particulièrement dans l'initiation de la réponse. Comme résultat, la décision qu'une cellule B particulière soit activée par un antigène particulier a une grande composante opérationnelle. Cependant, une immunisation efficace est suivie par une mutation somatique importante des gènes qui codent pour les polypeptides du site de liaison de l'anticorps (Berek et Milstein, 1987; Rajewsky, 1987). A mesure que des cellules d'affinité de plus en plus forte pour l'antigène sont sélectionnées pour une prolifération ultérieure, l'affinité des autoanticorps résultants augmente progressivement".

"La réponse vigoureuse des cellules B et T suivant une transplantation d'organe montre qu'il n'y a pas de distinction moléculaire catégorique entre les antigènes

" soi " et étrangers. Ce qui est " soi " pour un individu est clairement étranger pour un autre. Aussi, la non-réponse à " soi " est apprise d'une manière ou d'une autre durant l'ontogénie du système immunitaire, quoique la fréquence de production des autoanticorps montre que l'autotolérance n'est pas absolue".

1.1.1.3 Mécanismes de la tolérance

En principe, il y a quatre moyens non mutuellement exclusifs d'acquérir l'autotolérance (Nossal, 1989) :

1. Assurer un moyen pour que les autoantigènes n'entrent pas en contact avec le système immunitaire. (C'est le cas des spermatozoïdes dont les protéines ne sont immunogéniques que lorsqu' injectées dans l'organisme).
2. Créer un répertoire de cellules suppressives qui inhibent l'activation ou la fonction des cellules potentiellement anti-soi.
3. Rayer du répertoire les cellules qui réagissent contre les autoantigènes.
4. Fournir aux cellules anti-soi immatures un pré-signal qui empêche leur réponse future à des stimuli qui sont normalement efficaces.

Plusieurs états de tolérance existent dans les deux types cellulaires B et T (Chiller et al, 1970; Nossal, 1983; Nossal, 1988) et leurs mécanismes ont été démontrés

(Roitt et al., 1985; Katz, 1978; Theofilopoulos, 1987).

1.1.2 Mécanismes de l'autoimmunité

L'autoimmunité est un état où la tolérance au soi est perdue.

Trois hypothèses ont été décrites pour expliquer cette perte (Roitt et al, 1985) (figure 1):

1. L'hypothèse originale de Burnet et Fenner selon laquelle tous les antigènes du soi entraînent l'élimination, chez le nouveau-né, des clones de lymphocytes T ou B anti-soi n'est plus acceptée. Selon cette théorie, la perte de tolérance au soi qui conduit à l'auto-immunité serait due à l'apparition de nouveaux clones de lymphocytes anti-soi due à des mutations pendant la vie adulte.
2. Selon la deuxième hypothèse, les clones de cellules B sont incapables de répondre aux antigènes à cause de l'absence d'activité T " helper " (Th) spécifique de ces antigènes. Ce mécanisme implique l'élimination clonale des cellules Th anti-soi. Un moyen de contourner cette tolérance est d'utiliser un antigène étranger qui associe les cellules B avec des cellules Th d'une autre spécificité qui peuvent alors se

substituer au clone Th manquant. D'autre part, l'utilisation de substances adjuvantes ou de mitogènes des cellules B permet de se passer d'une activité Th.

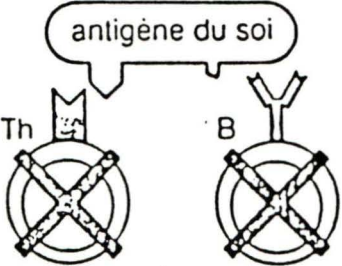
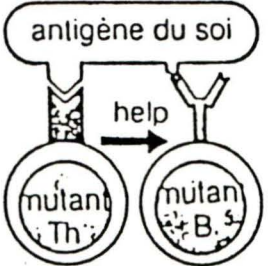
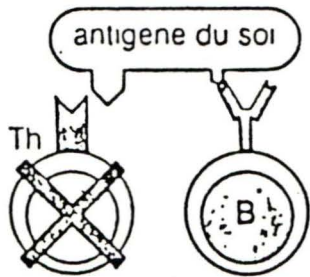
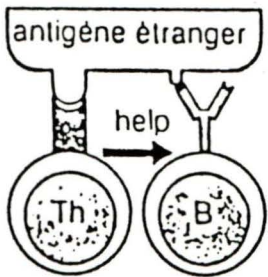
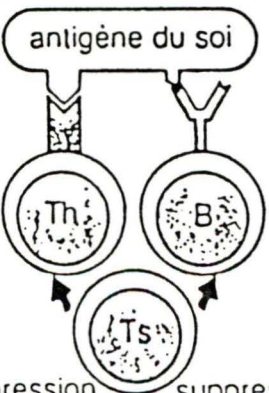
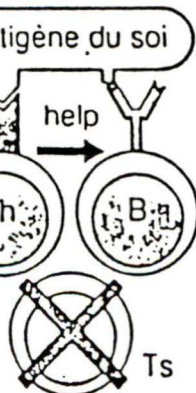
3. La troisième hypothèse ne suppose pas d'élimination clonale mais la suppression continue de la fonction des cellules B et Th par des cellules T suppressives (Ts). La perte des cellules Ts entraîne la perte de tolérance. Cette troisième possibilité peut être considérée comme un mécanisme de sauvegarde capable de supprimer tout auto-anticorps produit à la suite d'un défaut d'élimination clonale.
4. D'autres mécanismes de l'auto-immunité qui ne font pas appel à un dérèglement cellulaire existent : le mimétisme moléculaire, le réseau idiotype et anti-idiotype et l'activation polyclonale non spécifique. Ces mécanismes pourraient avoir une certaine importance et dans la discussion de nos résultats nous y reviendrons.

1.1.3 Conséquences de l'autoimmunité

Le terme autoimmunité possède la connotation générale d'une réponse immune contre des autoépitopes qui normalement devraient être tolérés (McKay et al, 1986; Smith et Steinberg, 1983; Weigle, 1971).

Figure 1: Perte de la tolérance au soi.

Tiré du livre Immunologie fondamentale
et appliquée, Roitt, I. Brostoff, J &
Malw, D. Médecine et Sciences
Internationnales. Paris (1988) p.12.11

	maintien de la tolérance au soi	rupture de la tolérance au soi
historique		
élimination des Th		
suppression		

1.1.3.1 Autoantigènes et autoanticorps

Les autoanticorps présents dans le phénomène d'auto-immunité sont des anticorps fabriqués par un individu contre des structures présentes dans son organisme. Les antigènes vis-à-vis desquels sont dirigés les autoanticorps sont appelés autoantigènes. Ce sont des antigènes tissulaires ou cellulaires aussi bien que des antigènes présents sur des molécules sécrétées par diverses cellules (immunoglobulines, facteurs de coagulation...).

1.1.3.2 Maladies autoimmunes

Les maladies autoimmunes peuvent être spécifiques ou non-spécifiques d'organe.

Dans les maladies autoimmunes spécifiques d'organe, on retrouve les antigènes essentiellement localisés dans un organe donné. De plus, les lésions qui y apparaissent sont dues à l'antigène tissulaire qui est la cible de l'attaque immunologique. C'est le cas de la thyroïdite d'Hashimoto.

Dans les maladies autoimmunes non-spécifiques d'organe, l'antigène est répandu dans l'organisme entier et les lésions sont dues aux dépôts de complexes immuns circulants. C'est le cas du LED où les complexes immuns se

retrouvent dans les reins. Et c'est le cas de la PR où les complexes immuns se déposent dans les articulations.

Trois maladies auto-immunes sont importantes pour notre étude : le LED, la PR et le SS.

Le LED est une maladie inflammatoire chronique, qui résulte d'un trouble immunorégulatoire sous l'influence de facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux (Wallace et al, 1987). La description originale de cette maladie a été attribué à Bielt (1822). En 1851, Cazenave a été le premier à utiliser le nom de lupus érythémateux pour décrire les manifestations cutanées. Hargraves, Richmond et Morton ont décrit la présence de cellule LE (Buyon et Zuckerman, 1987) et l'observation subséquente d'Haserick, que cette cellule résulte d'un AAN, a donné naissance aux connaissances actuelles à propos de cette maladie autoimmune. Le LED est une dysfonction du système immunitaire. Les anticorps présents reconnaissent en fait des formes distinctes d'ADN : soit exclusivement l'ADN natif bicaténaire, soit exclusivement l'ADN dénaturé monocaténaire, soit les deux à la fois (Tan, 1989). Il existe donc une grande hétérogénéité des déterminants antigéniques reconnus. Les anticorps anti-ADN natifs sont les anticorps les plus spécifiques et probablement les plus nocifs dans la maladie lupique. On peut retrouver d'autres types d'AAN dans ces mêmes sérums. On peut les détecter par

le test d'immunofluorescence indirecte sur des noyaux entiers. La distribution de la fluorescence peut être homogène, mouchetée, périphérique ou plus rarement nucléolaire. La fluorescence homogène traduit la présence d'anticorps anti-protéines et acides anti-désoxyribonucléiques (histones, ADN). La fluorescence périphérique est liée à la présence d'anticorps anti-ADN ou anti-lamines. La fluorescence mouchetée peut être liée à plusieurs anticorps qui réagissent soit avec des U₁-RNP ou soit avec l'antigène Sm, soit avec l'antigène La(SS-B). En plus de ces AAN, d'autres anticorps non-spécifiques d'organe ont été associés à la maladie lupique: il en est ainsi des anticorps anti-ARN bicaténaire ou monocaténaire et des anticorps dirigés contre des structures cytoplasmiques : les ribosomes, les lysosomes et les protéines Ro(SS-A). Il y a aussi des facteurs rhumatoïdes et des anticorps dirigés contre certains facteurs de coagulation (tableau 1) (Ce tableau est incomplet puisque d'autres auto-anticorps ont été décrits depuis contre les lamines, la vimentine, les microfilaments, des enzymes variés, etc... Ces différents anticorps n'ont pas d'incidence sur notre propos.) La physiopathologie du LED est fondée sur la présence de complexes immuns circulants qui se déposent dans la microvasculature. Les sites de dépôts étant disséminés à travers l'organisme, on comprend que les manifestations sont multiples et que la maladie peut avoir des modes d'expression très variés. C'est la raison pour laquelle on

Tableau 1: Autoanticorps sériques retrouvés dans la
 maladie lupique.

Tiré du livre Maladies dites systémiques,
Kahn, M.F. & Peitier, A.P. Flammarion
médecine sciences. France (1982) p. 211

Autoanticorps sériques dans la maladie lupique

Anticorps dirigés contre les constituants nucléaires

- DNA natif
- DNA dénaturé
- Nucléoprotéines solubles et insolubles
- Antigène Sm
- Ribonucléoprotéine (RNP)
- Antigènes protéiques : SS-B, SS-A, MA, PCNA, MU...
- Histones

Anticorps dirigés contre les constituants cytoplasmiques

- Ribosomes
- Glycoprotéine cytoplasmique (Ro)*
- Ribonucléoprotéines cytoplasmiques (La)*
- Lysosomes
- Mitochondries

Anticorps dirigés contre certains facteurs de la coagulation

Anticorps dirigés contre des antigènes lipidiques : " faux BW "

Anticorps dirigés contre diverses cellules

- Globules rouges (test de Coombs)
- Plaquettes
- Lymphocytes : T, B
- Cellules nerveuses

IgM anti-IgG : facteurs rhumatoïdes

Anticorps dirigés contre le RNA

- RNA double hélice (virus?)
- RNA simple hélice (RNA de transfert, RNA messenger?)
- Hybride DNA-RNA
- RNA synthétiques : poly A poly U

Anticorps anti-virus endogène de type C : gp 70, p 30

Anticorps anti-idiotypique?

* La nature glycoprotéinique du Ro est incertaine. La distribution du La et du Ro peut être soit nucléaire, soit cytoplasmique, dépendant de l'état d'activation cellulaire.

a recours pour son diagnostic à une série de critères cliniques et biologiques (annexe II).

La PR est une maladie inflammatoire chronique des articulations. L'inflammation des tissus articulaires contribue à endommager ou à détruire les articulations. La plupart (80%) des sujets atteints de PR ont dans leur sérum des anticorps dirigés contre les immunoglobulines G. Ces anticorps anti-IgG, sont appelés facteurs rhumatoïdes. On retrouve deux types d'anti-IgG, les anti-IgG natifs et les anti-IgG dénaturés, et ces derniers sont retrouvés en plus grande quantité. Les facteurs rhumatoïdes réagissent avec un déterminant antigénique situé sur le fragment Fc des IgG. La réaction des facteurs rhumatoïdes augmente la taille des complexes immuns, facilitant ainsi leur précipitation dans les articulations. Le sérum des PR contient des AAN (35 à 40 %) et des complexes immuns circulants où l'antigène principal est l'IgG (cf Annexe II).

Le SS est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par une exocrinopathie auto-immune soit l'infiltration lymphoplasmocytaire des parenchymes glandulaires causant une baisse des sécrétions (cf Annexe II). Plusieurs symptômes caractérisent la maladie. L'atteinte des glandes lacrymales et salivaires est responsable du syndrome sec. L'extension du processus à d'autres glandes exocrines vient enrichir la symptomatologie

(Radoux et al, 1987). Le processus lymphoïde peut aboutir à une transformation lymphomateuse. Si le SS est isolé, il s'agit du SS primaire. Si le SS est associé avec une autre collagénose telle LED ou la PR, on dit qu'il s'agit d'un SS sec secondaire.

Certains AAN recherchés en immunofluorescence sont très souvent présents au cours du S.S. Ceux-ci sont constitués d'un antigène surtout cytoplasmique, Ro(SS-A), et d'un antigène surtout nucléaire La(SS-B) , tous deux solubles (Hardin, J.A. et Mimori, 1985). Ils ont été extraits d'une lignée de cellules lymphoblastoïdes humaines ou de rate humaine (Alspaugh et al, 1975, 1976, 1979). Même si ces deux autoanticorps sont caractéristiques du SS primaire (90%), on peut aussi y retrouver de façon concomittante jusqu'à 70% de facteurs rhumatoïdes.

1.1.3.3 Mécanismes immunopathologiques des maladies autoimmunes

Les complexes immuns, formés par la combinaison de molécules d'anticorps et d'antigènes, ont été impliqués dans des réactions inflammatoires associées à certaines manifestations des maladies autoimmunes. Les complexes immuns peuvent être formés localement lorsque l'antigène est présent et accessible dans un tissu et donner lieu à une réaction d'Arthus (prédominance de polynucléaires).

Ils peuvent aussi se former dans le sang circulant si l'antigène y est soluble et se déposer secondairement dans divers organes au niveau des parois vasculaires.

Dans le LED, on retrouve des complexes immuns circulants contenant ADN, anti-ADN et des composants du complément qui se déposent dans les tissus (Tan 1989). L'activation du système complémentaire entraîne la séquence flogistique.

La déposition des complexes immuns est influencée par plusieurs facteurs:

1. L'isotype de l'anticorps (les complexes légers sont plus solubles que les gros).
2. L'avidité des anticorps (influence la précipitabilité).
3. La présence de facteur rhumatoïde (influence la taille : "super complexe").
4. La capacité des anticorps de fixer ou non le complément (IgG, IgG3, IgM fixent davantage).

Pour la PR, les complexes immuns sont intraarticulaires. Ceci est dû au fait que les facteurs rhumatoïdes (habituellement des IgM), retrouvés dans la PR, sont dirigés contre la partie Fc de l'IgG qui peut elle même avoir une activité anti-IgG, augmentant ainsi la taille du complexe immunitaire ("piggy-back") et facilitant sa précipitation dans les articulations.

Le SS est souvent associé à la PR (70%), ou au LED (30%) (textbook cf même que l'annexe II), mais ses mécanismes immunologiques restent obscurs : l'intervention d'autoanticorps, le dépôt de complexes immuns et l'agression cellulaire directe faisant intervenir les cellules T sont tous des mécanismes possibles.

Cependant, ces mécanismes ne sont pas facilement applicables aux systèmes Ro/La. Le fait que l'anti-Ro soit associé à des conditions pathologiques spécifiques suggèrent qu'il a un rôle pathogénique à jouer. Ainsi, l'anti-Ro a été non seulement observé dans un sous-groupe de malades atteints de LED ou PR (Boire, Ménard 1991). Mais également dans le lupus cutané sub-aigu et le lupus néonatal dans le lupus dit séro-négatif. A noter que le fait que l'anti-Ro soit associé avec une photosensibilité accrue donne du poids à l'observation "in vitro" de l'expression de l'antigène Ro à la surface de kératinocytes humains en culutre après irradiation UV.

1.2 Propriétés moléculaires des antigènes Ro(SS-A) et La(SS-B)

1.2.1 Classification

Les anticorps AAN désignent tout anticorps qui est dirigé contre des structures du noyau d'une cellule. Ils sont produits chez 99% des patients souffrant d'un LED, chez 90% des patients démontrant le SS et chez 35-40% des patients atteints de PR. L'étude de ces anticorps a joué un rôle central en rhumatologie pour plusieurs raisons (Hardin et Mimori, 1985). Un nombre croissant de ces anticorps sont reconnus comme marqueurs biologiques et servent donc au diagnostic (ex. : anti-ADN et LED, anti-Scl70 et sclérodermie, etc...). D'autres AAN ont une valeur pronostique et peuvent être utilisés pour ajuster le traitement des patients (ex. : anti-ADN). Quelques AAN ont un rôle pathogène démontré, participant à la génération de lésions dans les tissus (ex. : anti-ADN et néphrite lupique). L'information concernant la structure et les fonctions biologiques des autoantigènes, ciblés par les anticorps, peuvent fournir un aperçu de l'étiologie et de la pathogénèse. C'est dans cet optique et considérant son importance clinique que nous nous sommes intéressés au système Ro(SS-A) et anti-Ro(SS-A).

Plusieurs espèces d'ARN sont présentes à l'intérieur des cellules : l'ARN ribosomal (rARN), l'ARN messager (mARN), l'ARN de transfert (tARN) et les petits ARN. Tous peuvent être la cible d'autoanticorps. Les petits ARN dont l'existence même a été spécifiquement dévoilée par l'étude moléculaire systématique d'auto-anticorps provenant de sérum de patients atteints de maladie auto-immune font l'objet de cette étude (Lerner, Steitz, 1981). Selon leur localisation cellulaire, ces petits ARN peuvent être désignés comme les petits ARN cytoplasmiques (" small cytoplasmic RNA " ou ScRNA ou YRNA) ou comme les petits ARN nucléaires (" small nuclear RNA " ou SnRNA ou URNA). Ces ARN sont complexés de façon non covalente avec des protéines pour former des petites particules de RNP. Les RNP ribonucléoprotéines cytoplasmiques sont surtout associées avec le Ro(SS-A) mais aussi avec le La(SS-B) ("small cytoplasmic ribonucleoproteins" ou SCYRP) tandis que les ribonucléoprotéines nucléaires sont associées surtout avec le La(SS-B) ("small nuclear ribonucleoproteins" ou SNURP) (Lerner et Steitz, 1981; Steitz et al, 1982).

Plusieurs de ces RNP avaient une existence insoupçonnée avant qu'on les découvre dans les maladies autoimmunes. Dans certains cas, on connaît maintenant la fonction de ces RNP (tableau 2).

Les complexes autoanticorps-Ro(SS-A) ou autoanticorps-La(SS-B) impliquent trois types de molécules :

- 1- l'autoanticorps spécifique;
- 2- les protéines antigéniques Ro ou La et;
- 3- les molécules particulières d'ARN complexées par ces protéines.

Donc le complexe comporte deux sites d'interaction spécifique : le site de l'interaction immunologique autoanticorps-autoantigène et le site de l'interaction biochimique protéine-ARN. A ce second site, les protéines semblent reconnaître des séquences de bases spécifiques. De plus, il est possible qu'il existe dans le complexe une association des protéines Ro et La (Eisenberg, 1985).

1.2.2 Caractérisation de l'antigène Ro(SS-A)

L'antigène qui est l'objectif de la présente étude est l'antigène Ro(SS-A) qui est une composante d'une ribonucléoprotéine surtout cytoplasmique (SCYRP). La protéine Ro a été identifiée et caractérisée (Clark et al, 1969). Les anticorps contre cette protéine se trouvent chez 30% des patients atteints de LED, et 90% des patients avec un SS primaire, et ne sont rencontrés que rarement (5, 10%) chez les patients atteints du SS associé à la P.R. Alsbaugh et Tan (1975) ont décrit deux lignes de précipitation SS-A et SS-B, trouvées dans des immunodiffusions doubles effectuées avec des sérums de patients atteints de SS.

Tableau 2: Particules de ribonucléoprotéines reconnues
par les autoanticorps.

Tiré de Hardin, J.A. & Mimori, T. (1985)
Autoantibodies to ribonucleoproteins. Clin.
Rheum. Dis. 11; 494.

PARTICULES DE RIBONUCLEOPROTEINES
RECONNUES PAR LES AUTOANTICORPS

<u>AUTOANTICORPS</u>	<u>RIBONUCLEOPROTEINES</u>		
	<u>ARN</u>	<u>PROTEINES</u>	<u>FONCTIONS</u>
SnRNP Anti-U1 RNP	U1	68 kD A,B',C B,D,E,F,G	Lie le site d'épissage en 5' du pré-mARN
Anti-U2 RNP	U2	A',B'',D,E,F,G	Lie la séquen- ce du point de branchement
Anti-Sm	U1,U2,U4/U6, U5	B',B,D?	
Anti-U3	U3	?	
Anti-La(SS-B)	La ARN	50 kD	Participe dans la synthèse de l'ARN comme co-facteur pour l'ARN polymerase III
Anti-Th	Th ARN (7.2-8.2 ARN)	?	
Anti-hn RNP	hn ARN	31-42 kD	Précurseur du pré-mARN
Anti-5s rARN	5s rARN	35 kD	
ScRNP Anti-Ro(SS-A)	Ro ARN (Y1-Y5)	60 kD	?
Anti-Jo-1	t-ARN ^{His}	Histidyl-ARN synthetase	Histidyl-ARN synthetase
Anti-tARN	t-ARN	?	

Alspaugh et Maddison (1979) ont démontré que la protéine Ro et la ligne de précipitation SS-A sont des antigènes identiques dans plusieurs variétés d'extraits cellulaires, d'où l'appellation de l'antigène Ro(SS-A). Par ailleurs, ils trouvent que l'antigène La(SS-B) était identique.

La localisation intracellulaire de l'antigène Ro(SS-A) est controversée. Clark et al (1969) ont décrit l'antigène Ro(SS-A) comme étant un antigène soluble cytoplasmique. Alspaugh et Tan (1975) ont démontré qu'il est un antigène soluble nucléaire donnant à l'immunofluorescence une apparence finement mouchetée ou homogène. Cependant, l'antigène Ro(SS-A) est considéré comme étant majoritairement d'origine cytoplasmique car le matériel immunoréactif provient exclusivement des composants cytoplasmiques (Clark et al, 1969; Hendrick et al, 1981; Bachmann et al, 1986). Par ailleurs, le sérum anti-Ro(SS-A) donne une fluorescence nucléaire avec les cellules Wil-2 et des lignées lymphoblastoïdes (Alspaugh et Tan, 1975; Alspaugh et Tan, 1976). L'antigène Ro(SS-A) se retrouve dans différentes espèces mais on remarque une variabilité apparente de distribution entre les espèces. De petites quantités d'antigènes Ro(SS-A) sont détectées chez la souris, le rat, le lapin, le hamster et le poulet. Par contre, des quantités plus importantes sont retrouvées chez le chien, le porc, le singe et l'humain (Harmon et al, 1984). Chez l'humain, l'antigène Ro(SS-A) est présent dans

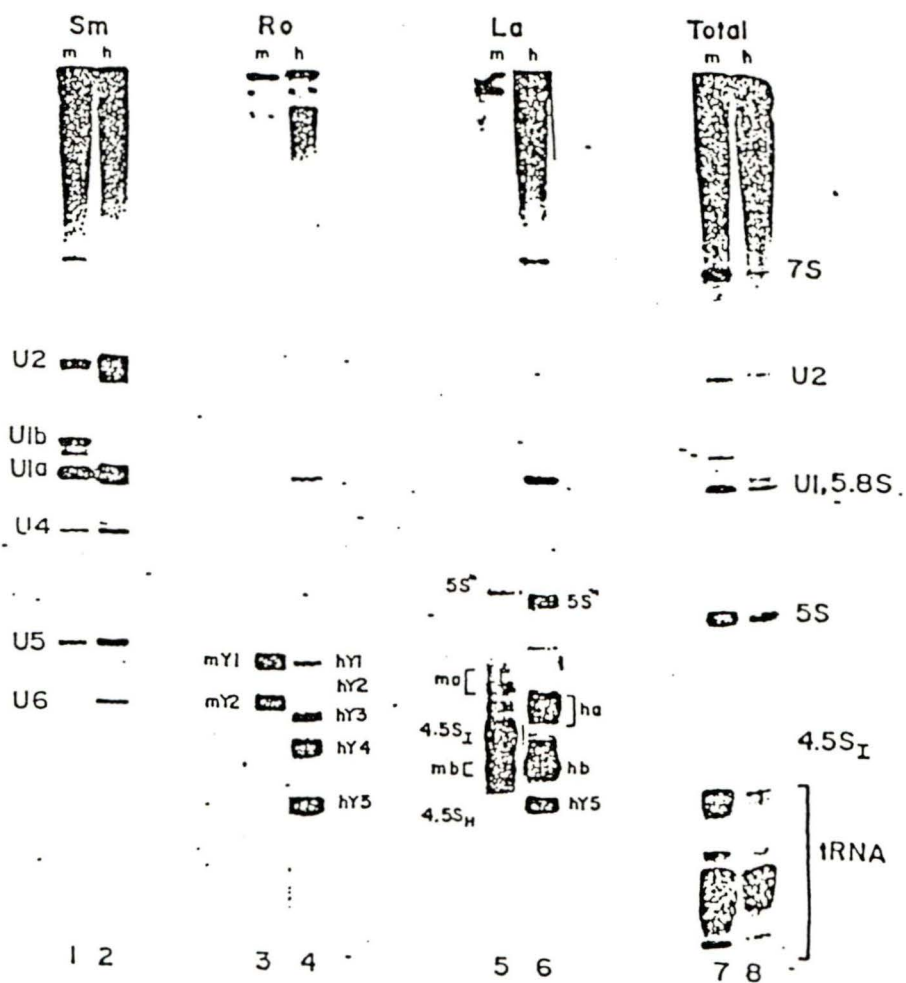
une variété de tissus incluant les reins, le foie, la rate, le myocarde, le placenta, les cellules parenchymateuses, fibroblastiques, lymphoïdes et épithéliales (Harmon et al, 1984). De plus, l'antigène Ro(SS-A) peut être obtenu à partir de cultures de cellules telles : Wil-2 (cellules de lymphocytes B humains transformées par le virus d'Epstein-Barr), HeLa (carcinome cervical humain), Hep-2 et Raji (cellules cancéreuses du larynx humain), Sal-1 (cellules tumorales de la glande salivaire humaine) et Molt-4 (cellules T humaines leucémiques lymphoblastiques) (Alspaugh, 1975, 1976).

La protéine Ro(SS-A) humaine, dont la fonction n'a pas été encore définie, consiste en un polypeptide simple acide (pI 4.3 à 5.5), de masse moléculaire d'environ 60 kD (Elkon et Culhane, 1984). Cette protéine est associée chez l'homme avec quatre petits acides ribonucléiques (ARN hY1, hY3, hY4, hY5) dont la longueur varie de 83 à 112 nucléotides. Le hY2 est reconnu maintenant comme un produit de dégradation de hY1 (Hendrick et al, 1981; Wolin et Steitz, 1983) (figure 2). Ces ARN sont complexés de façon non-covalente mais ferme avec la protéine Ro(SS-A). De plus, on remarque un nombre variable suivant les espèces d'ARN associés au Ro(SS-A) : le complexe contient 2 ARN chez la souris, 3 ARN chez le rat et 4 ARN chez le boeuf. L'ARN du Ro (Ro RNA) est peu abondant dans les cellules HeLa, il y a environ 1 à 5×10^5 copies, soit 1% de la

Figure 2: Immunoprécipitation de l'extrait de cellules HeLa humaine (h) et d'un ascite de cellules de souris Ehrlich (m).

Tiré de Hendrick et al, (1981) Ro(SS-A) small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La(SS-B) ribonucleoproteins: Further characterization of the Ro(SS-A) and La(SS-B) small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. Mol. Cell.Biol.

1. Les puits 1 et 2 ont été précipités par un sérum anti-Sm. Les puits 3 et 4 par un sérum anti-Ro. Les puits 5 et 6 par un sérum anti-La et les puits 7 et 8 ont été précipités par les petits RNAs totaux



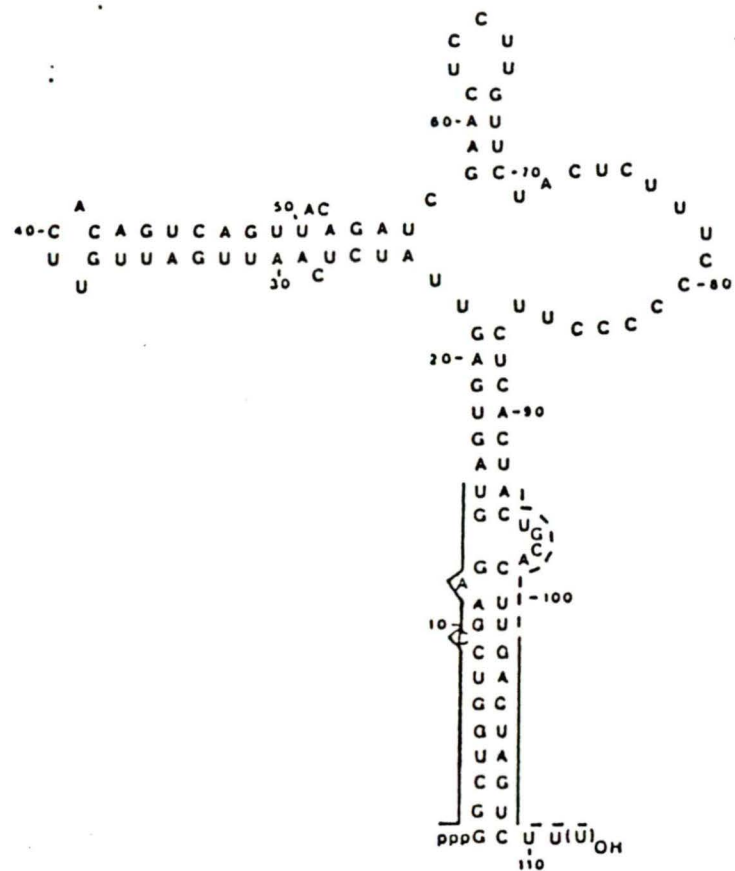
quantité totale d'ARN (Wolin et Steitz, 1984). L'ARN polymérase III transcrit ces petits ARN (Wolin et Steitz, 1983) (figure 3).

On connaît bien la structure des petits ARN en forme de feuille de trèfle. Le polypeptide Ro(SS-A) de 60 kD se lie à une région spécifique de l'ARN qui est hautement conservée d'un ARN à l'autre. Cette région est située sur la section proximale de l'extrémité formée par complémentarité des bouts 5' et 3'. Cette région, constituée de sept paires de bases et d'une boucle de cytidine, est conservée dans tous les petits ARN qui lient le Ro(SS-A) (Wolin et Steitz, 1984) (figure 3). Wolin et Steitz (1983) ont caractérisé un clone génomique humain qui hybride deux des quatres ARN du Ro, hY1 et hY3. La séquence du clone démontre plusieurs homologies entre hY1 et hY3 avec hY5. La famille des gènes d'ARN du Ro(SS-A) présente des caractéristiques uniques :

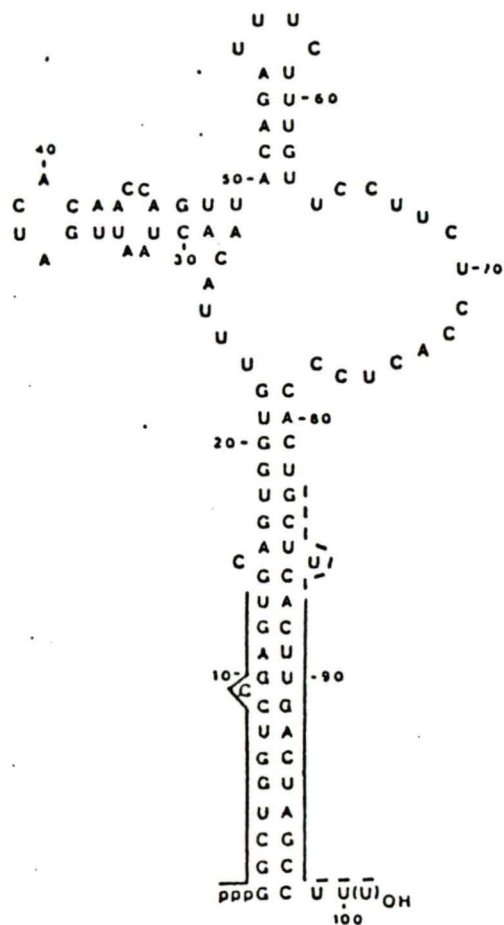
1. Il y a une seule copie de chacun des gènes dans le génome humain. Ceci est intéressant étant donné que plusieurs copies de gènes sont requises pour transcrire en quantité suffisante les ARN structuraux tels que rARN, tARN et SNURP.
2. Ces gènes ne codent pas pour des protéines.

Figure 3: Structure secondaire proposée des ARN hY₁,
hY₃ et hY₅.

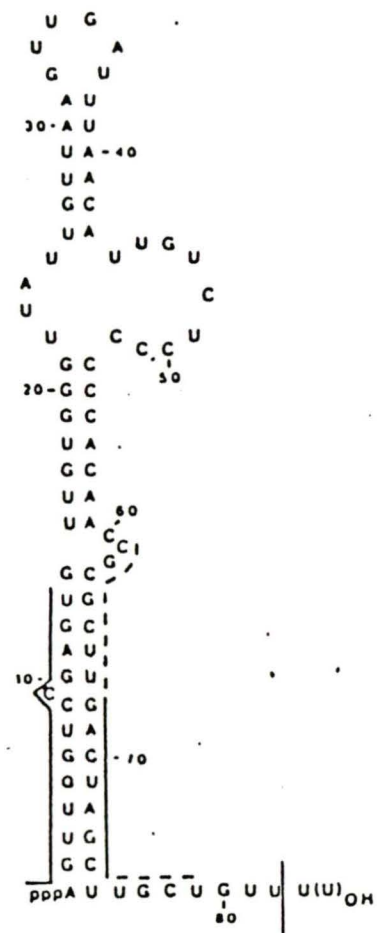
Tiré de Wolin, S.L. & Steitz, J.A. (1983)
Genes for two small cytoplasmic Ro(SS-A)
RNAs are adjacent and appear to be single
copy in the human genome. Cell 32; 739.



hY1



hY3



hY5

3. Ces gènes sont localisés dans une seule région du génome humain contrairement aux gènes codant pour les autres petits ARN nucléaires, tARN et mARN qui sont dispersés dans le génome. Au contraire, les gènes hY1 et hY5 sont adjacents (Wolin et Steitz, 1983).

L'activité antigénique de Ro(SS-A) est généralement indépendante de l'ARN. Ceci a été démontré par le fait que l'immunoprécipitation de Ro(SS-A) n'est pas affectée si la particule d'ARN est séparée par dénaturation ou par le traitement avec la RNase (Reichlin, 1986).

Par contre, l'activité antigénique de Ro(SS-A) est abolie lorsque le pH est plus grand que 9 ou plus petit que 5 (Clark, 1969). L'antigène Ro(SS-A) est stable pendant 30 minutes à la température de 50°C. Une augmentation de la température cause une diminution progressive de l'activité après 30 minutes jusqu'à l'inhibition complète de l'antigène à 70°C.

Ni le nombre exact de protéines associées à la particule de Ro RNP, ni l'hétérogénéité de Ro(SS-A) elle-même n'ont été bien définis. Wolin et Steitz, (1984), affirment que le composant majeur de la protéine Ro(SS-A) est un simple polypeptide antigénique de 60 kD. Récemment, Ben-Chetrit et al (1988) ont démontré la présence d'un autre

composant antigénique, une protéine de 52 kD. Le polypeptide de 52 kD montre des différences antigéniques avec la protéine de 60 kD, étant donné que chaque polypeptide peut réagir avec une population distincte d'anticorps. Donc, la possibilité que la protéine de 52 kD soit un produit de dégradation de la protéine de 60 kD est improbable. Ceci a été confirmé par l'absence de réactivité croisée entre les anticorps purifiés par affinité de chaque protéine et aussi par l'absence de fragments communs résistants à la protéase lors d'une protéolyse partielle de ces protéines (Ben-Chetrit et al, 1988). La protéine Ro de 52 kD et celle de 60 kD sont associées avec les quatre mêmes petits ARN (hY1,hY3,hY4,hY5). Rader et al (1989) ont confirmé l'hétérogénéité de l'antigène Ro; en plus du composant antigénique majeur de 60 kD , ils ont trouvé une protéine de 52 kD dans les lymphocytes et une protéine de 54 kD dans les globules rouges (Rader et al, 1989). Le Ro contenu dans les globules rouges existe en association avec seulement deux des quatres ARN (hY1 et hY4). Ces résultats suggèrent deux nouvelles populations distinctes de protéines Ro(SS-A), une dans les lymphocytes et l'autre dans les globules rouges.

Boire et Craft (1989) ont décrit un nouvel anticorps spécifique qui reconnaît la particule de Ro qui contient l'ARN hY5 (particule RohY5). Ces anticorps apparaissent comme liant un déterminant antigénique

conformationnel, un polypeptide de 60 kD associé à l'ARN hY5. Ce déterminant est trouvé seulement sur la particule de ribonucléoprotéine Ro humaine (Boire et Craft, 1989).

Boire et Craft (1989) ont également purifié partiellement la particule de Ro native à partir de cellules Hela qui apparaissaient immunologiquement et biochimiquement intactes, sans dégradation significative des ARN ou de ses composantes protéiniques. Ils ont trouvé que les particules contenant la protéine Ro(SS-A) native se répartissent en trois sous-populations : une population contenant seulement l'ARN hY5 (particule RohY5), une population contenant seulement l'ARN hY4 (particule RohY4) et une autre population contenant les ARN hY1, hY3 et hY4 (particule RohY1-hY4). La masse moléculaire de la particule de Ro(SS-A) mesurée par chromatographie d'exclusion, est d'environ 230 kD pour le RohY5 et 300 à 350 kD pour les autres particules de Ro- ARN. Par contre, d'autres chercheurs ont rapporté que la particule de Ro(SS-A) native possédait une masse moléculaire de 100 à 150 kD, avec la même méthode de mesure (Scopelitis et al, 1980; Yamagata et al, 1984). Les différentes masses moléculaires observées pour les particules de Ro RNP sont probablement dues à l'utilisation de méthodes de purification qui ne respectent pas l'intégrité de la protéine.

Ben-Chetrit et al (1989), ont isolé et caractérisé un clone d'ADN complémentaire codant pour la protéine Ro(SS-A) humaine (Ben-Chetrit et al, 1989). Un sérum de patient atteint de SS a été utilisé pour cribler la banque d'ADN complémentaire. Celle-ci fut construite à partir d'ARN messager provenant de cellules T humaines leucémiques lymphoblastiques. Le clone immunoréactif isolé possède une taille d'environ 1.8 Kb. La transcription et la traduction *in vitro* du clone d'ADN complémentaire a permis la synthèse d'un polypeptide de 57.5 kD qui est spécifiquement immunoprécipité par un anticorps anti-Ro(SS-A). De plus, l'identification de la protéine Ro encodée par le DNA complémentaire a été confirmée par l'identité des cartes peptidiques de la protéine codée et de l'antigène Ro de 60 kD des cellules HeLa. La séquence d'ADN complémentaire montre que la protéine Ro(SS-A) de 57.5 kD possède des séquences spécifiques de liaison à l'ARN et un site de liaison aux acides nucléiques de type "doigt de zinc" (Berg, 1986; Frankel, 1988). L'analyse détaillée de la structure moléculaire et l'identification de la fonction de la particule de ribonucléoprotéine Ro(SS-A) sont maintenant possibles grâce à son clonage. Les hypothèses de fonction à vérifier :

1. La ribonucléoprotéine de Ro(SS-A) pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la distribution de l'ARN messager en forme active ou non-active dans la traduction (Kato et al, 1982).

2. L'antigène Ro(SS-A) pourrait faire partie d'un complexe cellulaire possédant une activité endoribonucléase VII (Bachmann et al, 1987). Cette activité pourrait jouer un rôle dans la régulation du mARN comme signal dans l'emmagasinement de ce dernier dans le cytoplasme.
3. Le fait que la protéine Ro(SS-A) de 60 kD possède une structure en doigt de zinc capable de se lier aux acides nucléiques suggère qu'à cause de la ressemblance de la protéine avec le facteur de transcription IIIA, elle posséderait un rôle de régulation dans la transcription (Miller et al, 1985).

Keene a aussi isolé et caractérisé un clone d'ADN complémentaire codant pour la protéine Ro(SS-A) humaine (Deutscher et al, 1988). Ce clone d'ADN complémentaire code pour une protéine de 60 kD. La protéine possède les mêmes caractéristiques que la protéine obtenue par Ben-Chetrit et al, soit l'identité immunologique à la protéine Ro, la liaison de la protéine au RNA et la présence d'un doigt de zinc. Lieu et al ont caractérisé à l'échelle moléculaire l'antigène Ro(SS-A) humain (Lieu et al, 1988). Ce groupe a déterminé l'identité des 25 premiers acides aminés N-terminaux. Ils ont montré que l'extrémité N-terminale de la molécule était soit l'acide glutamique soit l'alanine, ce qui implique une certaine hétérogénéité de la molécule. Cette hétérogénéité a été aussi démontrée par le groupe de Rader (Rader et al, 1989). Lieu et al ont de plus montré

que le peptide N-terminal 6-19 était capable d'induire un anticorps reconnaissant la protéine Ro native purifiée. Le fragment N-terminal 6-19 représenterait donc un épitope majeur de l'antigène Ro natif.

1.2.3 Caractérisation de l'antigène La(SS-B)

Selon les observations faites par études électrophorétiques en conditions non- dénaturantes, on peut constater que la protéine Ro(SS-A) peut être associée à une autre protéine reconnue par des sérums lupiques, la protéine La(SS-B). Le La(SS-B) possède une masse moléculaire d'environ 50 kD (Elkon et al, 1984). L'immunoprécipitation par un sérum anti-La(SS-B) montre une large bande de petits ARN, incluant les formes précurseurs du 5S rARN et des tARN ainsi que de certains petits ARN viraux. (Lerner et al, 1981; Rosa et al, 1981; Rinke et Steitz, 1982) Le La(SS-B) possède un pI de 4.2 à 4.8 (Elkon et al, 1984). Eisenberg a trouvé que les particules de Ro(SS-A) et de La(SS-B) sont, soit liées sous forme de complexe, soit libres (Eisenberg, 1985; Deng, 1984; Hardin, 1986). Etant donné que le La(SS-B) peut-être associé avec les formes précurseurs du 5S ARN et tARN, mais non avec les espèces matures correspondantes, la protéine La(SS-B) pourrait jouer un rôle dans la maturation de ces ARN (Rinke et Steitz, 1982). Lorsque la protéine La(SS-B) se lie à l'ARN du Ro, elle reconnaît un

site de liaison constitué d'une séquence d'oligo-U avec un groupement hydroxyl 3'-terminal. Puisque l'ARN du Ro contient un site de liaison spécifique pour chacune des protéines Ro(SS-A) et La(SS-B), l'existence d'une particule où les deux protéines coexisteraient serait possible expliquant ainsi la formation simultanée d'anticorps anti-Ro et anti-La (figure 4).

A partir d'une banque lambda gt11 d'ADN complémentaire de foie humain, Chambers et Keene (1985), ont isolé à l'aide d'anticorps La(SS-B) monoclonaux murins des clones codant pour une partie de la protéine La(SS-B) (Chambers et al, 1988). Ces clones ont été utilisés pour sélectionner par hybridation des ARN messagers dans de l'ARN total cytoplasmique de cellules HeLa. Ces ARN messagers sont traduits *in vitro* en une protéine d'environ 50 kD qui a les propriétés suivantes:

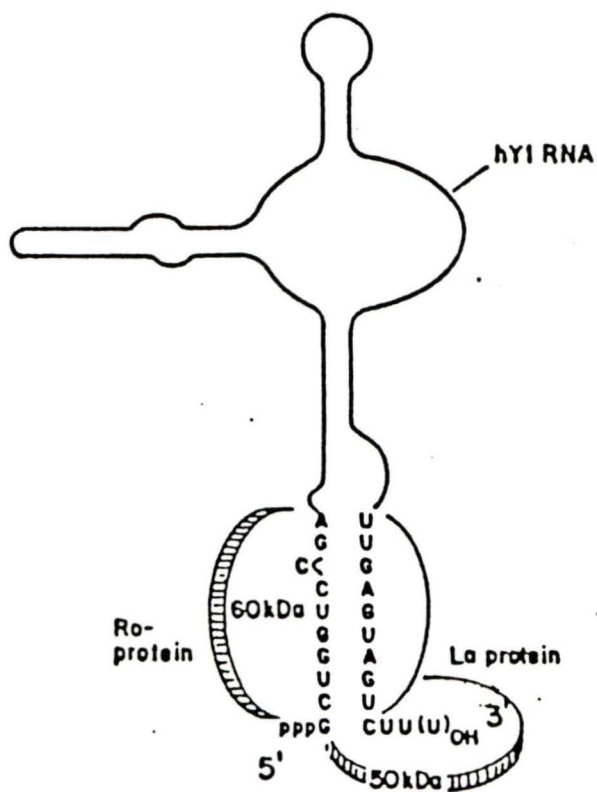
1. Elle comigre avec la protéine La(SS-B) des cellules Hela.
2. Elle réagit spécifiquement avec les anti-La(SS-B) (ELISA).
3. Sa carte peptidique est identique à celle du La(SS-B) humain.

A partir de deux clones reconnus par l'anti-La(SS-B), Chambers et Keene (1988) ont observé :

Figure 4: Hypothèse de la co-existence de l'antigène
Ro(SS-A) et La(SS-B) humain, sur la même
particule.

D'après Hardin, J.A. (1986) The lupus
autoantigens and the pathogenesis of systemic
lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 29;
458.

Ro scRNP



1. Un fragment d'ADN complémentaire de 390 nucléotides comprenant 366 nucléotides codant pour 122 résidus d'acides aminés localisés dans la région C-terminale et suivis de 24 nucléotides non-codants.
2. Un fragment de 165 nucléotides codant pour 55 résidus d'acides aminés du C-terminal (12% de la protéine) suivis de 1200 nucléotides non-codants.

On retrouve donc au moins un site antigénique dans les 55 acides aminés C-terminaux. Ce site est probablement le décapeptide hydrophile à la surface du La(SS-B) natif. Sturgess et al (1988) ont synthétisé des sondes d'oligonucléotides à partir de la séquence d'ADN complémentaire déterminée par Chambers et Keene (1985). Ces oligonucléotides ont été utilisés pour cribler une banque lambda gt10 d'ADN complémentaire d'une lignée cellulaire obtenu à partir d'un lymphome de Burkitt. Un clone de 1.4 Kb a été isolé. Il code pour un polypeptide de 40.1 kD constitué de 355 résidus d'acides aminés localisés dans la partie C-terminale de la protéine La(SS-B). Même s'il réagit spécifiquement avec les anti-La(SS-B) en immunoblot, il ne couvre pas la totalité de la protéine La(SS-B) qui a la taille de 50 kD. Ce clone montre des différences importantes avec celui de Chambers et Keene (1985) :

1. Le clone de Sturgess et al (1988) débute avec un résidu guanine localisé dans un site EcoRI authentique, tandis que le clone de Keene et al (1985) possède 27 bases en

5' précédant la guanine du clone de Sturgess et al. De plus, le clone de Keene et al (1985) ne possède pas ce site de clonage EcoRI.

2. Le clone de Sturgess et al possède deux cytidines aux positions 133 et 134 et un codon d'arrêt à la position 1065. Le clone de Chambers et Keene n'a qu'une seule cytidine à la position 133 ce qui décale le cadre de lecture et fait apparaître un codon d'arrêt prématuré à la position 165. Donc, le clone de Sturgess et al possède 926 bases codantes de plus en direction 3' tandis que le clone de Chambers et Keene ne peut pas être traduit en une protéine aussi longue. A partir du clone de 1.4 Kb, Sturgess et al ont isolé 3 sous-clones dans des vecteurs plasmidiques d'expression, dans le but d'investiguer la réactivité des protéines produites avec l'anti La(SS-B) et de localiser les épitopes de la protéine. Seul le sous-clone III qui code pour les 103 acides aminés C-terminaux est reconnu par l'anti-La(SS-B), indiquant la présence d'un épitope dans cette région.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Préparation de l'autoantigène Ro(SS-A)

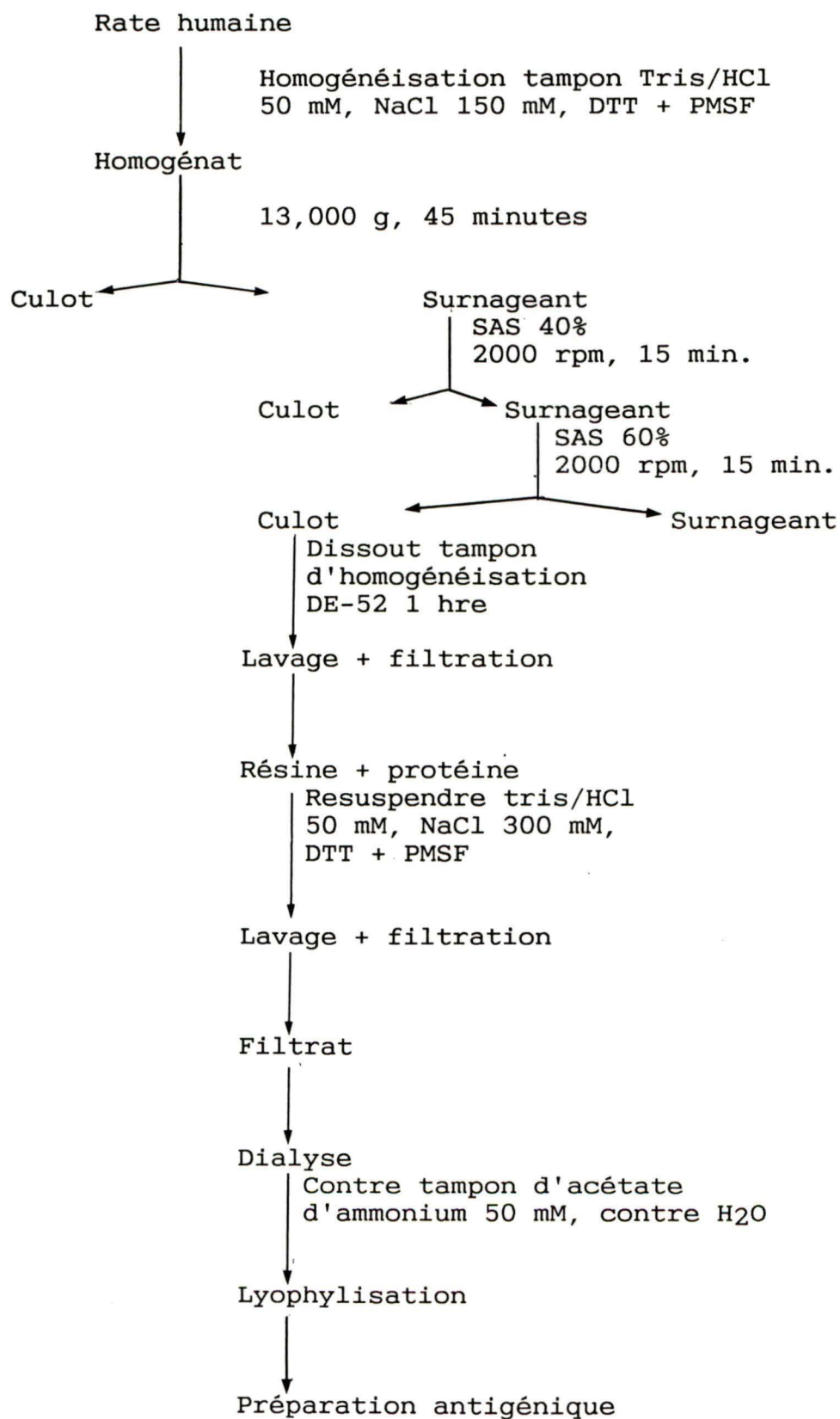
La préparation est résumée dans le tableau 3. Le Ro(SS-A) est extrait de la rate humaine. Les rates humaines utilisées proviennent soit d'autopsie de personnes normales ou soit de splénectomies pratiquées au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Dans ce cas, la rate est obtenue 30 à 60 minutes suivant l'intervention. Les rates sont nettoyées afin d'enlever le maximum de sang possible, la graisse, la capsule et les morceaux fibreux. Il reste la pulpe qui sert à extraire l'antigène Ro(SS-A). Toutes les étapes se font à 40°C sauf les filtrations. La rate (100-150g) est découpée en cubes de 2 cm de côté environ, et est homogénéisée dans un volume de 4 ml/g de rate de tampon d'homogénéisation 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.02% NaN₃, 1.5 mM de DTT et 1.5 mM PMSF. L'homogénat est clarifié par centrifugation à 13,000g (centrifuge Sorvall, rotor GSA) pendant 60 minutes et le surnageant est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium 40% (Alspaugh, 1975). Le mélange est agité pendant 3 hres à 40°C et centrifugé à 12,000g durant 30 minutes. Le surnageant est ajusté à 60% de saturation par addition de sulfate d'ammonium solide, agité pendant 3 hres à 40°C et centrifugé dans les mêmes conditions. Le précipité obtenu est dissous dans le tampon d'homogénéisation et mélangé, pendant 1 hre,

avec 500 mg de diéthylaminoéthyl cellulose (DE-52)/par gramme de rate. Le DEAE-cellulose a été pré-équilibrée avec le tampon d'homogénéisation. On lave la résine avec le tampon d'homogénéisation jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 280nm de 0.01 et on resuspend la résine dans le tampon d'extraction 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.02% NaN₃, 1.5 mM DTT et 0.15 mM PMSF. L'extrait est récupéré par filtration et mis à dialyser d'abord contre 10 volumes d'acétate d'ammonium 50 mM, pH 7.0 et ensuite contre 10 volumes d'eau distillée et l'extrait dessalé est lyophilisé (Boire et Ménard, 1988). Le tableau montre les étapes de purification. La poudre lyophilisée est utilisée à des concentrations appropriées comme source d'antigène dans toutes les expériences subséquentes (Tableau 3).

2.2 Sérums de référence

Les sérums de référence anti-Ro(SS-A) et anti-La(SS-B) ont été obtenus du Center for Disease Control (CDC, Atlanta, GA). Ces sérums ont été utilisés pour identifier et définir les sérums contrôles locaux utilisés dans les techniques d'immunodiffusion (ID) et d'immunoblot (IB). Douze sérums provenant d'adultes normaux des deux sexes ont été utilisés comme témoins négatifs et ont donné constamment un résultat négatif par les deux techniques ID et IB. Les sérums de patients souffrant de PR ou de LED selon les critères de l'American Rheumatism Association (Schumacher et

Tableau 3: Représentation schématique de la technique de purification partielle des antigènes protéiques Ro(SS-A) et La(SS-B).



al, 1988) sont recueillis, codés et congelés en fractions de 1ml à -20°C afin d'être utilisés pour des test ultérieurs. Toutes les déterminations d'anticorps ont été faites en duplicata, tant en ID qu'en IB.

2.3 Immunodiffusion double

Nous utilisons une variante de la méthode d'Ouchterlony (Ouchterlony, 1949). Les sérums sont disposés dans six macropuits arrangés en rosette autour du puits central contenant l'antigène dans une plaque de gel d'agarose 0.6%. Les sérums sont utilisés sous forme non-diluée, et lorsqu'ils sont positifs, ils sont titrés par dilution, par la même méthode. Pour la détection de l'anti-Ro(SS-A), le puits central contient 1250 ug d'extrait de protéines provenant de la rate humaine, dans un tampon PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH 7.6 et NaCl 150 mM). Pour la détection de l'anti-La(SS-B), on incorpore 2% de polyéthylène glycol dans l'agarose, pour éviter la diffusion du La(SS-B). La source d'antigène est un extrait commercial de thymus de lapin (50 ul d'une solution 60 mg/ml). Les sérums donnant une ligne de précipitation d'identité définie avec les sérums de référence anti-Ro(SS-A) et anti-La(SS-B) sont considérés positifs.

Pour démontrer que les lignes de précipitation d'identité définie contiennent bien les antigènes

spécifiques, elles sont extraites, fractionnées sur gel de polyacrylamide et soumises à l'immunoblot. Pour l'extraction, les plaques d'Ouchterlony sont lavées 18 heures dans un tampon PBS, et lavées pendant 1 hre dans l'eau distillée. Les lignes de précipitation sont alors coupées, broyées et éluées dans un tampon 65 mM Tris/HCl pH 6.8, 10% glycérol et 4.6% dodécyl sulfate de sodium (SDS). Cette préparation est utilisée pour analyses par électrophorèse en gel 10% polyacrylamide, en conditions dénaturantes non-réductrices.

2.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransfert.

Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide sont effectuées entre des plaques de verre verticales. Le gel est de 1 mm d'épaisseur avec 5 cm de gel séparateur à 10% d'acrylamide et de 1 cm de gel concentrateur à 7.5% d'acrylamide ("mini protean II cell" Bio-Rad Richmond, CA). Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide 10%, sous des conditions réductrices et dénaturantes, sont effectuées selon la méthode de Laemmli (1970) (acrylamide : bisacrylamide; 73:2). L'extrait de rate humaine est utilisé à une concentration de 8 mg/ml (la méthode Bradford utilisée pour la détermination de la concentration des protéines) et chauffé dans de l'eau à 100°C pendant 3 minutes dans un tampon de dissolution de l'échantillon contenant 2% SDS, 10%

glycérol, 62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, et 5% 2-mercaptoéthanol. L'échantillon de 100 µl, contenant 850 µg de protéines est déposé sur le gel concentrateur. L'électrophorèse s'effectue à 165 volts durant 45 minutes, dans le tampon d'électrophorèse 25 mM Tris/HCl pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS et ceci à l'aide de l'appareil jusqu'à ce que les protéines de référence aient migré de 6 cm. Les standards utilisés proviennent de Sigma Chemical Co. (St-Louis MO). Dans quelques expériences, les immunoglobulines provenant de sérums normaux humains ont été préparées par chromatographie échangeuse d'ions pour être utilisées comme marqueur de masses moléculaires (52 kD, chaîne gamma) dans des gels ou des membranes de nitrocelluloses. Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide contenant du SDS dans des conditions non-réductrices, sont effectuées de la même manière excepté que les échantillons sont dissous dans un tampon sans mercapto-éthanol.

Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide, dans des conditions natives (N-PAGE) sont effectuées d'après une adaptation de la méthode de Davis (1964). L'extrait de rate humaine (8 mg/ml) est dissout dans 10% glycérol, 25 mM Tris/HCl pH 8.3, 192 mM et centrifugé à 12,000 g durant 1 minute. Le surnageant non bouilli et sans SDS (100 µl/gel) est soumis à une électrophorèse sur gel contenant 2.5% acrylamide (gel concentrateur) et 7.5% acrylamide (gel séparateur). Pour montrer que les anticorps sont dirigés

contre les protéines et non contre les ARN du complexe antigénique, l'extrait de rate humaine a été incubé pendant 30 minutes à la température de la pièce avant l'électrophorèse native, avec la ribonucléase A pancréatique (1 mg/ml) dans un tampon de 5 mM MgCl₂, 25 mM Tris/HCl pH 8.3 et 192 mM glycine. Dans les conditions réductrices non-dénaturantes, l'extrait est traité avec 5% de 2-mercaptoéthanol. Les protéines peuvent ensuite être colorées au bleu de Coomassie R-250 (coloration du gel dans 0.1% de bleu de Coomassie, 50% méthanol et 10% acide acétique) et lavées dans 20% méthanol et 5% acide acétique. Les gels non-colorés sont être transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les gels sont préalablement équilibrés dans le tampon de transfert 25 mM tris/HCl pH 8.3, 192 mM glycine , 20% méthanol et 0.1% SDS. Pour les gels natifs, l'électrotransfert s'effectue dans un tampon acide acétique 0.7% (100 volts, 60 min). Les feuilles de nitrocellulose sont ensuite incubées avec agitation (16 heures) dans 3% de sérum albumine bovine (BSA), 10 mM Tris/HCl pH 7.4 et 150 mM NaCl, pour saturer les sites réactifs.

2.5 Immunoblot

Les feuilles de nitrocellulose sont lavées deux fois dans un tampon TBS 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 et 0.5% BSA, et incubées avec des dilutions appropriées de sérums durant 1 heure à la température de la

pièce, et ce à l'aide de l'appareil " mini blotter" (Immunetics Cambridge, MA). Cet appareil divise la feuille de nitrocellulose en minochambres permettant d'incuber chaque échantillon soumis à l'électrophorèse avec des sérums antigéniques différents. Chaque minichambre contient approximativement 25 ug de l'extrait de rate humaine en contact avec 40 ul de sérum dilué. Le dépistage de sérums positifs est possible à de faibles dilutions (1/20) sans observer d'interférences non-spécifiques. Les sérums positifs sont dilués en série pour l'obtention de titres semi-quantitatifs. Les feuilles de nitrocellulose sont ensuite lavées dans un tampon de lavage (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 M NaCl, 0.1% Tween-20) et incubées avec l'anti-IgG humaine spécifique pour la chaîne gamma et conjuguée à la peroxydase (dilution 1:1000) durant 1 hre à la température de la pièce. Les feuilles sont ensuite lavées trois fois dans le tampon TBS. Le développement de la coloration est obtenu par immersion dans une solution de 30 mg de 4-chloro-1-naphtol et 20 ul de peroxyde 30%, dans 40ml de tampon Tris/HCl pH 7.4 et 10 ml d'éthanol.

2.6 Épuisement des anticorps dénaturés du polypeptide Ro(SS-A).

Quatre sérums anti-Ro(SS-A) ont été sélectionnés pour leur capacité à reconnaître l'antigène Ro(SS-A) dénaturé ou natif sur nitrocellulose. Pour enlever les

anticorps dirigés contre le polypeptide Ro dénaturé, la bande de Ro dénaturée du nitrocellulose est coupée et incubée avec l'un des sérums à une dilution appropriée (différente pour chaque sérum). Ceci est répété avec de nouvelles bandes de nitrocellulose fraîches contenant le polypeptide Ro dénaturé jusqu'à ce que le sérum ne réagisse plus avec le polypeptide Ro dénaturé sur un blot de type Laemmli. Le sérum épuisé est alors incubé avec la nitrocellulose contenant le Ro natif. Pour mettre en évidence une adsorption non-spécifique des anticorps au nitrocellulose, des volumes identiques de sérum ont été incubés en parallèle avec des bandes du nitrocellulose ne contenant pas l'antigène Ro(SS-A) de 60 kD.

2.7 Immunoprécipitation d'un extrait de cellules radiomarquées

Les cellules ont été radiomarquées de deux manières: les acides nucléiques ont été marqués au ^{32}P et les protéines ont été marquées à la méthionine ^{35}S . Les cellules HeLa proviennent de "l'American Type Culture Collection" et sont cultivées à 37°C , 5% CO_2 dans le milieu RPMI 1640, contenant 10% de sérum de veau fœtal, 60 ug/ml de pénicilline et 100 ug/ml de streptomycine.

Le marquage et l'immunoprécipitation des ARN ont été effectués selon la méthode utilisée par Hendrick et al,

(1981). Les cellules resuspendues (2×10^5) dans 1 ml de milieu sans phosphate, ont été marquées avec 10 uCi/ml de [^{32}p] orthophosphate durant 12-14 hres. Les cellules ont été récoltées et lavées une fois dans un tampon TBS. Après resuspension dans 10 ml de tampon Net-2 (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40) ,les cellules refroidies sur la glace ont été soniquées 5 fois pour des périodes de 30 secondes. La suspension a été clarifiée par centrifugation à 12000 g pendant 20 minutes et les surnageants ont été immédiatement utilisés comme source d'antigène. L'antigène radioactif a été purifié par immunoaffinité sur complexe d'anticorps et de protéine A-Sépharose. Dix μl de sérum de patients ont été incubés 16 heures à 40C avec 2 ug de protéine A-Sépharose CL-4B dans 500 μl de tampon d'immunoprécipitation IPP (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% Nonidet p-40). Les billes de résine couvertes d'anticorps sont lavées 3 fois dans le tampon IPP et suspendues dans 400 μl de tampon Net-2. Elles sont incubées avec 100 μl d'extrait marqué au ^{32}P avec agitation par rotation pendant une heure à 40C. Ensuite, 5 lavages avec le tampon Net-2 sont effectués et les billes sont suspendues dans 300 μl de tampon Net-2, 15 μl de 20% SDS, 30 μl de 3 M acétate de sodium pH 5.2. Les acides nucléiques sont extraits par du phénol, chloroforme, et 3-méthyl 1-butanol (50:50:1) contenant la 8-hydroxyquinoline comme anti-oxydant. Les acides nucléiques présents dans la phase aqueuse sont précipités par 2 volumes d'éthanol. Les

acides nucléiques sont dissous dans 400 μ l de tampon (RNA simple buffer) et fractionnés sur gel 10% polyacrylamide/urée 7 M à 400 V. Les gels sont alors séchés sur papier-filtre sous vide et la radioactivité est révélée par autoradiographie à -80°C avec un film XRP (Kodak X-OMAT RP).

Le marquage et l'immunoprécipitation des protéines ont été effectués par la méthode de Lerner et Steitz (Hendrick et al, 1981). Les cellules (2×10^5) ont été incubées dans 1 ml de milieu déficient en méthionine contenant 5 uCi de méthionine ^{35}S durant 14 heures. Les cellules sont collectées par centrifugation et lavées dans du tampon TBS. Elles sont resuspendues dans 10 ml de tampon Net-2 (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40). Les cellules refroidies sur glace sont soniquées trois fois pendant 30 secondes. Les extraits sont alors centrifugés à 12000 g durant 20 minutes et le surnageant est immédiatement utilisé comme source d'antigène.

2.8 Expérience d'électrophorèse par isofocalisation avec l'appareil Rotofor

Préparation des membranes:

Pour obtenir une meilleure séparation des protéines, les membranes de l'appareil Rotofor ont été lavées, avant le fractionnement, avec chaque fois 55 ml

d'eau distillée et désionisée. Ces lavages se font durant 5 minutes à une puissance de 5 W et ce jusqu'à l'obtention d'un courant de 1-2 mA. Ceci a pour effet d'enlever le surplus d'ions présents sur la membrane anionique ou cationique, qui pourraient diminuer le voltage de départ.

Préparation de l'échantillon:

Pour un maximum d'efficacité, il est recommandé de dessaler l'échantillon avant d'effectuer la séparation des protéines. On dessale l'échantillon en le dialysant contre de l'eau distillée et ce jusqu'à l'obtention d'une concentration maximale en sel de 10 mM. Il est important que la concentration de chaque composé présent dans l'échantillon n'excède pas 2-4 mg total afin de ne pas excéder la capacité de séparation de l'appareil. Il faut aussi ajouter des ampholytes (pH 3-10) à une concentration finale de 2% (Bio-Lyte). Donc, l'échantillon de départ (0,46 mg/ml) est dilué dans un volume de 55 ml d'eau distillée et déionisée, contenant 2.5 ml d'une solution d'ampholyte à 40%.

Tampons :

Le tampon utilisé pour l'anode est habituellement 0.1 M H_3PO_4 , et le tampon utilisé pour la cathode est 0.1 M NaOH.

Fractionnement :

La première séparation s'effectue à une puissance constante de 12 W. Le voltage de départ est de 300-500 V et est augmenté jusqu'à 800-1000 V. Après 6 heures de séparation, les fractions sont récoltées. On détermine par "dot blot" les fractions positives pour l'antigène Ro(SS-A) et La(SS-B). Le pH de chaque fraction est mesuré. Les fractions positives sont alors regroupées, pour être refractionnées de nouveau. Cette fois-ci, on n'ajoute pas d'ampholyte. Durant le fractionnement, le voltage peut atteindre 2000 V.

3. RESULTATS

3.1 Détection des anticorps anti-Ro(SS-A) et anti-La(SS-B) par la technique d'immunoblot

L'homogénat de rate humaine a été chromatographié sur cellulose DE-52. La fraction éluée avec le tampon TBS contenant 300 mM NaCl contenait les antigènes Ro(SS-A) et La(SS-B). Nous avons utilisé cette préparation pour effectuer une immunodiffusion, afin de vérifier si les sérums à tester contenaient les anticorps anti-Ro et/ou anti-La. Seul les sérums donnant une ligne de précipitation d'identité définie sont considérés comme des sérums positifs. Des 30 patients sélectionnés en immunodiffusion, tous sont évidemment positifs pour l'antigène Ro(SS-A) (100%) tandis que seulement 5 patients (16%) sont aussi positifs pour l'antigène La(SS-B). Cette expérience nous permet de sélectionner des sérums spécifiques anti-Ro(SS-A) et/ou anti-La(SS-B) qui seront utilisés dans cette étude.

Les sérums positifs ont été ensuite testés par immunoblot. Cette méthode comprend une électrophorèse sur gel polyacrylamide 10% SDS, un électrotransfert sur feuille de nitrocellulose et une immunoréaction. Le sérum anti-Ro de référence du CDC reconnaît une seule bande à environ 60 kD dans un immunoblot contenant un extrait dénaturé de rate humaine. Sur 30 sérums locaux, 27 soit 90%, reconnaissent

la même bande de 60 kD (fig. 5, sérum SG). Les sérums ne reconnaissent aucune bande correspondant à la protéine Ro(SS-A) de 52 kD. Les cinq sérums locaux qui reconnaissent la protéine La(SS-B) par immunodiffusion reconnaissent aussi l'antigène La(SS-B) par immunoblot. En dépit de l'utilisation d'inhibiteurs de protéase, le sérum anti-La du CDC et le sérum SG (fig. 5) reconnaissent deux bandes de protéine à 42 kD et à 45 kD sur la nitrocellulose contenant l'extrait dénaturé de rate humaine. Ceci peut s'expliquer par soit l'existence de produits de dégradation de la protéine La de 50 kD malgré les précautions prises, soit la présence de 2 isoformes de protéines La. Ceci n'a pas été poursuivi plus avant.

L'immunodiffusion et l'immunoblot sont des techniques comparables pour la sensibilité et la spécificité. Ces deux techniques donnent des résultats identiques. Cependant, la technique d'immunoblot est plus sensible, puisqu'on détecte généralement une réaction positive à une dilution de 100 à 300 fois plus grande que celle utilisée en immunodiffusion. De plus, dans l'immunoblot, la sensibilité n'affecte pas la spécificité puisqu'on peut tester des sérums normaux très concentrés (dilution 1/20) sans observer de bandes non spécifiques (fig. 5). Ainsi, à la figure 5, le sérum du patient lupique (S.G.) a donné encore une réaction positive anti-Ro à une dilution 1:10240 en immunoblot versus 1:64 en

Figure 5: Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des techniques d'immunodiffusion et d'immunoblot. La photo reproduit l'immunoblot de différents sérums testés : le résumé d'un patient lupique (SG), le sérum Ro positif du Centre de contrôle des maladies de Bethesda (CDC-Ro), le sérum d'un témoin normal (NHS) et le sérum La positif du Centre de contrôle des maladies de Bethesda (CDC-La). La chaîne lourde de l'immunoglobuline G humaine est utilisée comme marqueur de masse moléculaire. Dans le bas de la photo figurent les valeurs d'antigénicité Ro et La obtenues par immunodiffusion à partir des mêmes sérums.



immunodiffusion; le sérum de référence CDC anti-Ro a été positif à une dilution de 1:640 par la technique d'immunoblot par rapport à 1:2 par la technique d'immunodiffusion, et le sérum de référence CDC anti-La a été positif à une dilution de 1:2560 en immunoblot comparé à 1:8 en immunodiffusion. Le sérum témoin humain normal est négatif dans les deux techniques. Il est testé à une dilution de 1:20 en immunoblot et non-dilué en immunodiffusion.

3.2 Quelques sérums reconnaissent le polypeptide Ro(SS-A) de 60 kD en conditions natives seulement

Quelques sérums lient le polypeptide Ro 60 kD dans des essais natifs, mais ne reconnaissent pas le polypeptide Ro 60 kD dénaturé. En effet, 3 des 30 sérums positifs (10%) anti-Ro par la technique d'immunodiffusion, ne reconnaissent pas le polypeptide Ro 60 kD dénaturé présent dans les immunoblots (tableau 4). Ces trois sérums donnent une ligne d'identité définie, par immunodiffusion en gel agarose, avec des contrôles anti-Ro mais ne donne aucun résultat en immunoblot (Laemmli) (fig. 6, puits 2 et 4). Au cours de ce travail, ces trois sérums seront appelés "non blotteurs". Un sérum anti-U1 RNP/Sm, qui est un système différent du système anti-Ro(SS-A) ou anti-La(SS-B) et un sérum normal humain sont utilisés comme témoins négatifs (fig. 6, puits 3 et 6).

Tableau 4: Tableau comparatif du nombre de sérums
positifs obtenus par les techniques
d'immunodiffusion et d'immunoblot.

SERUMS	TECHNIQUE ID N (%)	TECHNIQUE IB N (%)
ANTI-Ro (SS-A)	30	27
ANTI-La (SS-B)	5	5
ANTI-Ro "NON BLOTTEURS "	3	0

Figure 6: Analyse par immunoblot de sérums "non blotteurs" anti-Ro (voir déf. p. 61). Une électrophorèse d'un extrait de rate humaine bouilli dans du SDS et du 2-ME a été faite. Les protéines séparées ont été transférées sur une feuille de nitrocellulose.

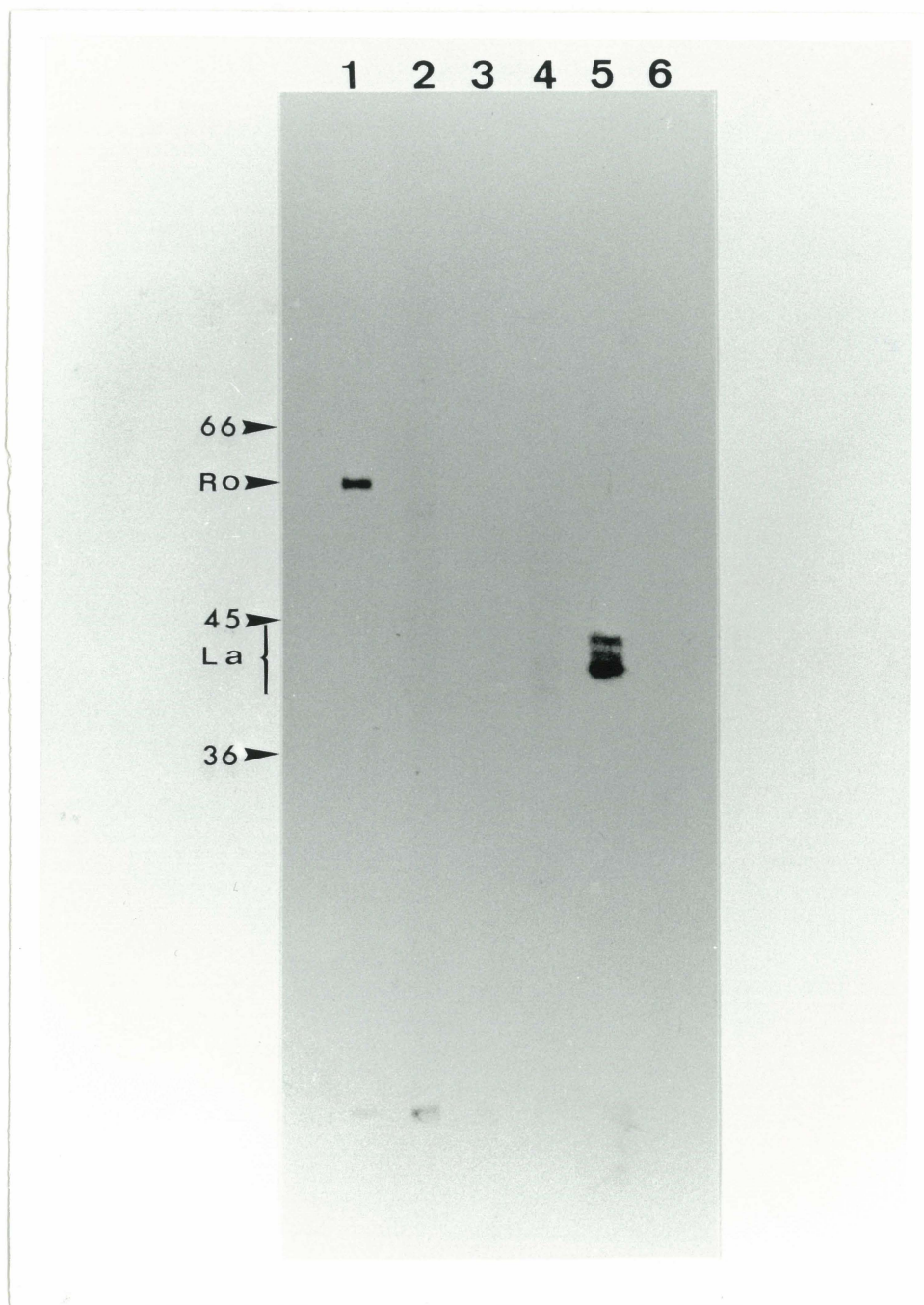
Puits 1: Sérum témoin anti-Ro dilué à 1:640.

Puits 2, 4: Sérum non blotteurs dilué 1:20.

Puits 3: Sérum témoin anti U_1 -RNP/Sm. Il est négatif parce que l'extrait ne contient pas cet antigène.

Puits 5: Sérum témoin anti-La dilué 1:320. La présence de 3 bandes est un artéfact dû à l'utilisation d'un sérum trop concentré.

Puits 6: Sérum normal humain dilué 1:20.



Il faut noter une corrélation clinique intéressante à l'effet les trois patients qui ont un sérum "non blotteurs" ont une PR et les 3 ont développé une éruption cutanée du type photosensible ressemblant à celle du LED sub-aigu.

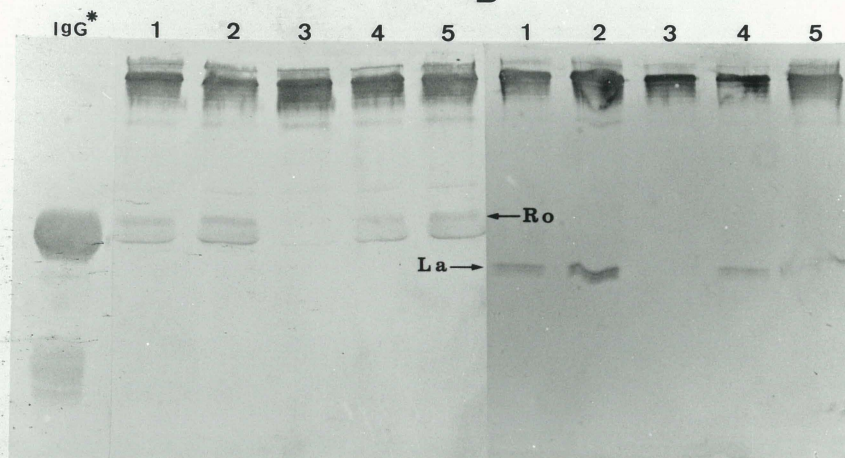
Pour démontrer la spécificité des sérums "non blotteurs" nous avons d'abord confirmé que les lignes de précipitation formées en immunodiffusion contiennent vraiment des antigènes Ro (fig. 7). Pour ce faire, les lignes de précipitation formées par les sérums de référence (tous ces sérums sont monospécifiques, tel que montré à la fig. 6 et fig. 8), anti-Ro (témoin positif, système étudié), anti-La (témoin positif, système relié), anti-U₁ RNP/Sm (témoin positif, système non relié) et aussi par les sérums "non blotteurs" ont été découpées, extraites et soumises à une électrophorèse en gel polyacrylamide dans des conditions dénaturantes sans 2-ME. (Dans ces conditions, l'antigène pénètre le gel tandis que l'anticorps ne le pénètre pas). Après l'électrotransfert sur feuille de nitrocellulose, le blot est incubé avec un sérum monospécifique anti-Ro par immuno-précipitation. Dans le panneau 7A, toutes les lignes de précipitation, excepté la ligne obtenue avec l'anti-U₁ RNP/Sm, contiennent l'antigène Ro puisqu'il y est reconnu par l'autre sérum spécifique à la protéine Ro de 60 kD. Dans le panneau 7C, révélé avec un

sérum anti-Ro non-blotteur, l'antigène Ro de 60 kD n'est pas reconnu. Dans le panneau 7B, révélé avec un anti-La, on retrouve l'antigène La, sauf dans le puits 3, malgré que trois des cinq lignes de précipitation (1, 2, 4) aient été obtenues avec des sérums ne contenant pas d'anti-La. La réaction avec le sérum anti-La est dirigée contre un antigène de plus basse masse moléculaire que le Ro de 60 kD, compatible avec les bandes de 42 et 45 kD (fig. 5). Notre interprétation de cette expérience est la suivante : les lignes de précipitation formées avec des sérums anti-Ro contiennent le Ro et le La, suggérant une association physique des deux antigènes et non comme suggérait antérieurement une réactivité croisée des antigènes Ro et La à moins que celle-ci ne soit visible qu'en ID (Eisenberg, 1985). En immunodiffusion, les anti-Ro non-blotteurs se comportent comme les anti-Ro blotteurs. Les témoins IgG* donnent des bandes variables fortement dépendantes de la concentration d'IgG. Ainsi, en 7A, un excès d'IgG a été appliqué. En 7C, pour rendre la bande d'IgG plus fine, nous avons diminué la concentration avec le résultat que 2 bandes apparaissent avec la bande du bas toujours plus franche. La figure 7 représente une expérience complexe qui a été reproduite à plusieurs reprises avec les mêmes résultats.

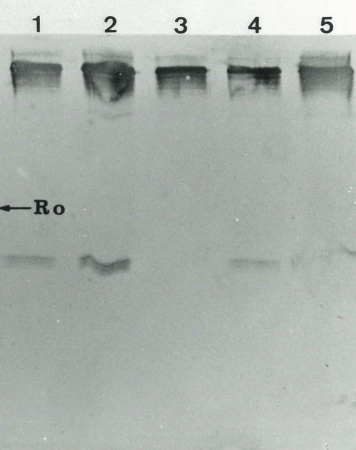
Les sérums "non blotteurs" reconnaissent un déterminant de la protéine Ro(SS-A) ou La(SS-B) qui est révélée par immunodiffusion et par immunoprécipitation mais

Figure 7: Immunoblots révélés après transfert des protéines extraites des lignes de précipitation obtenues en ID et séparées par des conditions dénaturantes non réductrices (avec SDS et sans 2-ME). Le puits 1 contient la précipitine obtenue avec un blotteur anti-Ro. Les puits 2 et 4 contiennent des précipitines obtenues avec des sérums anti-Ro non blotteurs. Le puits 3 contient la précipitine d'un sérum anti-U₁ RNP/Sm. Enfin, le puits 5 contient la ligne de précipitation obtenue avec un sérum anti-La. Deux marqueurs de masse moléculaire ont été utilisés : IgG* (panneau A et C) a été préparé en condition dénaturante (SDS) et réductrice (2-ME). Par ailleurs, l'autre IgG, (panneau C) a été préparé en condition dénaturante (SDS) et non réductrice (sans 2-ME) comme les anticorps contenus dans la ligne de précipitine. La section A a été incubée avec un sérum témoin anti-Ro monospécifique (1:50), la section B avec un sérum témoin anti-La monospécifique (1:50) et la section C avec un sérum anti-Ro "non blotteur" (1:50).

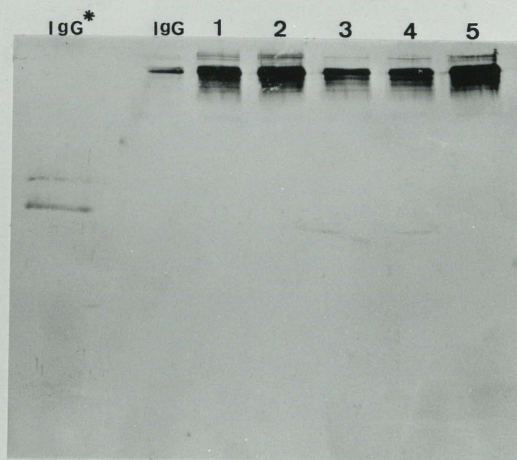
A



B



C



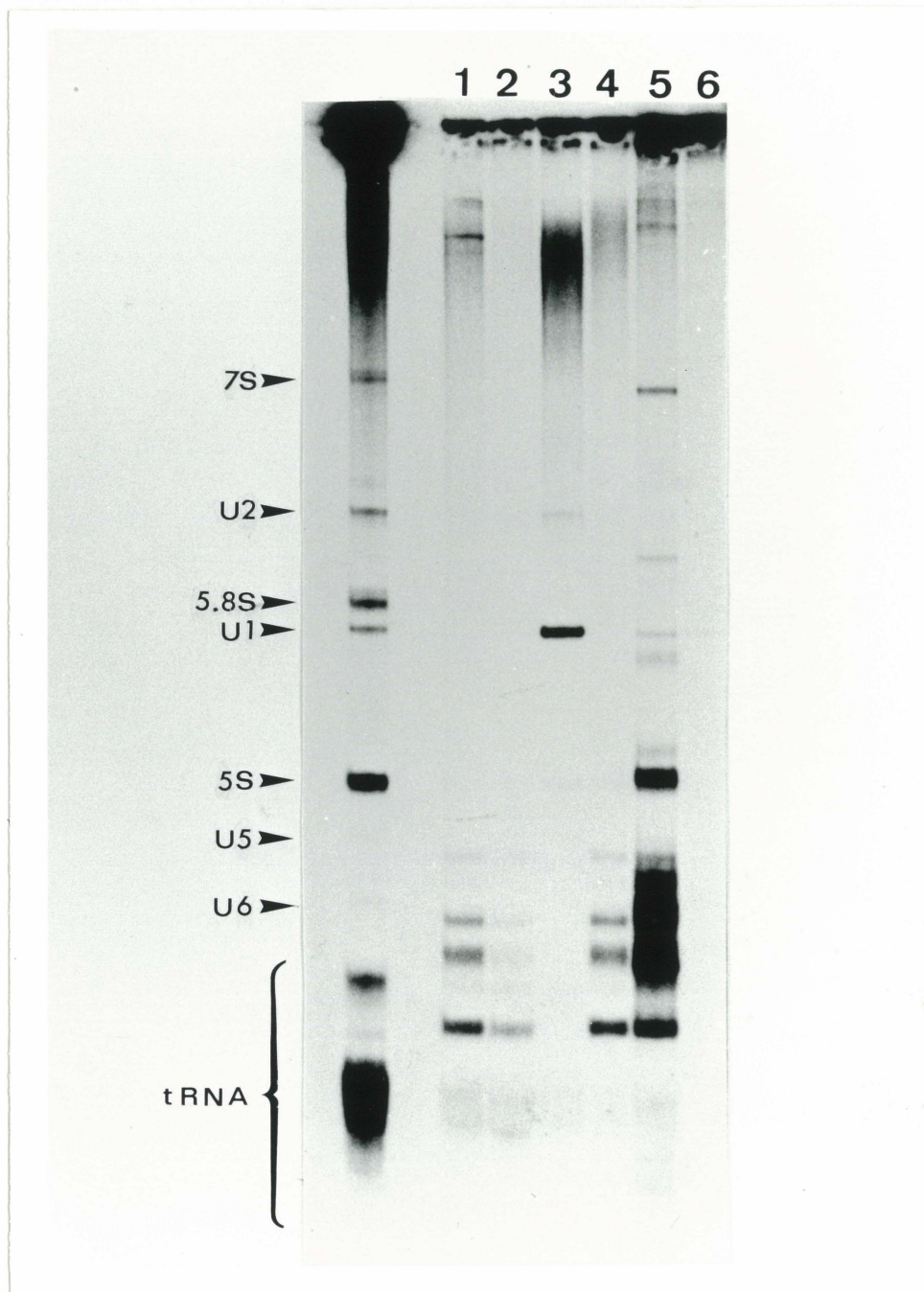
qui est absent en immunoblot dans des conditions dénaturantes. L'électrophorèse sur gel polyacrylamide contenant du SDS suffit pour réaliser les conditions dénaturantes qui abolissent la réaction des sérums non-blotteurs.

Des expériences d'immunoprécipitation ont été effectuées sur un extrait de cellules HeLa marquées au ^{32}P , afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle les sérums "non blotteurs" contiennent des anticorps anti-Ro et/ou anti-La. L'autoradiographie des ARN marqués au ^{32}P et séparés par électrophorèse montre que les sérums "non blotteurs" précipitent les ARN du Ro(SS-A) (fig. 8, puits 2 et 4), tout comme le sérum de référence anti-Ro (fig. 8, puits 1). Ceci est à contraster avec les RNA précipités par les sérums de référence anti-Sm/RNP (fig. 8, puits 3) et anti-La(SS-B) (fig.8, puits 5).

3.3 Comigration d'une portion des antigènes Ro(SS-A) et La(SS-B) en gel de polyacrylamide natif

Des expériences d'immunoblots avec des électrophorèses sur gel polyacrylamide dans des conditions non dénaturantes et non réductrices ont été effectuées afin de confirmer que les sérums anti-Ro "non blotteurs" reconnaissent les antigènes natifs (fig. 9). Bien que les bandes révélées soient moins bien définies que dans les blot

Figure 8: Immunoprécipitation d'un extrait de cellules HeLa marquées au ^{32}P . A gauche, on observe l'extrait total de cellules avec l'identification des ARN majeurs. Le puits 1 contient l'anti-Ro de référence. Les puits 2 et 4 contiennent les anti-Ro non-blotteurs. Le puits 3 contient l'anti- $\text{U}_1\text{RNP/Sm}$. Le puits 5 contient l'anti-La(SS-B) et le puits 6 contient le sérum normal humain. Les 3 sérums anti-Ro précipitent mieux le hY_5 alors que hY_1 est difficile à voir et que $\text{hY}_{3,4}$ sont plus pâles dans les puits 2.



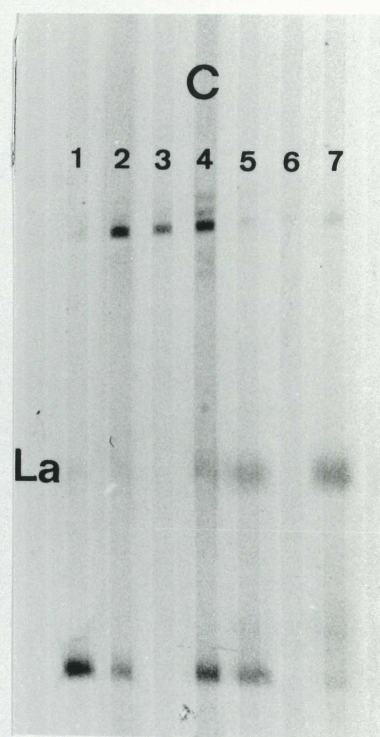
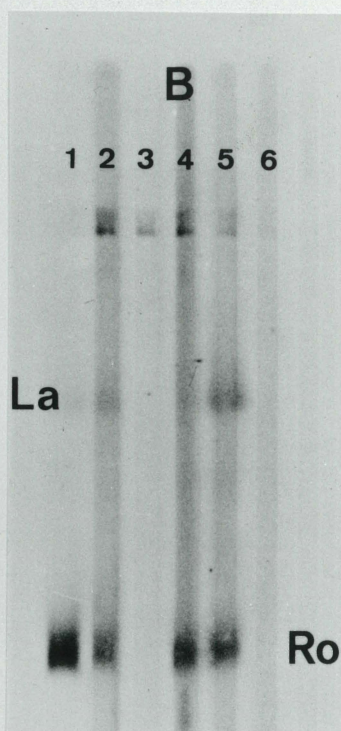
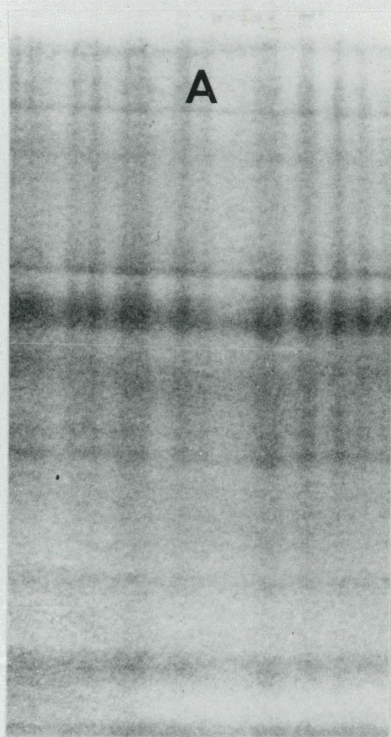
dénaturants obtenus par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS, l'immunodétection spécifique est positive comme le montre la comparaison avec les témoins. Les sérums anti-Ro reconnaissent deux bandes de protéines, une bande forte à une mobilité relative (R_m) de 0,75 et une plus faible à un R_m de 0,45 (fig. 9B, puits 1). Les sérums anti-U₁ RNP et les sérums normaux humains donnent des résultats négatifs (fig. 9B, puits 3 et 6 respectivement). Il apparaît que la bande de R_m de 0,75 contiendrait en majorité l'antigène Ro(SS-A) tandis que celle ayant un R_m de 0,45 contiendrait en majorité l'antigène La(SS-B). Ceci, en accord avec les observations faites par Lieu et al (1984). Les sérums "non-blotteurs" démontrent le même profil de réactivité que les sérums anti-Ro (fig. 9B, puits 2 et 4). Nous avons observé que tous les sérums anti-Ro ou anti-La colorent deux bandes (R_m 0,75 et 0,45) dans le gel natif. Est-ce que la présence des deux bandes est due à une association des deux antigènes via l'ARN ou à une simple association protéine-protéine?

Afin de vérifier, si l'ARN joue un rôle dans l'interaction Ro et La, l'extrait de rate humaine a été traité avec la ribonucléase A pancréatique (RNase A) avant d'effectuer l'immunodiffusion et l'immunoblot dans des conditions natives. On n'obtient aucune modification des résultats. Ceci indique soit que l'ARN ne joue pas de rôle dans l'interaction Ro et La, soit que l'ARN n'est pas

accessible à la digestion enzymatique dans le complexe natif. Pour vérifier la présence d'une association protéine-protéine par aggrégation du Ro(SS-A) et du La(SS-B), l'extrait de rate humaine a été traité avec 5% de 2-mercaptoéthanol, chauffé à 40°C durant 5 minutes, puis soumis à l'électrophorèse dans des conditions natives. Le résultat illustré à la fig. 9C, puits 1, révèle que la bande de l'antigène Ro(SS-A) à un R_m de 0,75 reste inchangé. Par contraste, la bande de R_m 0,45 (fig. 9C, puits 1, 2, 4, 5) spécifique de l'antigène La(SS-B) disparaît au profit d'une nouvelle bande de R_m 0,50 (fig. 9C, puits 4, 5). Dans la fig. 9C, le puits 7 est un sérum rare ne contenant que de l'anti-La(SS-B) (pas d'anti-Ro(SS-A) par ID et IB dénaturant) et lui aussi ne montre qu'une seule bande à R_m de 0,50. Etant donné que l'espèce initiale de RF 0,45 est remplacée par une espèce de mobilité plus grande, on peut attribuer ce phénomène à la dissociation des protéines agrégées par le traitement combiné au mercaptoéthanol et à la chaleur (40°C).

On a donc démontré que la protéine Ro(SS-A) possède au moins deux épitopes différents car plusieurs sérums reconnaissent les épitopes primaires de la protéine Ro(SS-A) par immunoblot de gels dénaturants et quelques sérums reconnaissent uniquement les déterminants conformationnels de cette même protéine, par immunoblot de gels natifs.

Figure 9: Immunoblot de gels de polyacrylamide natif d'un extrait de rate humaine. En A, on observe un exemple de gel coloré au bleu de Coomassie montrant des bandes de protéines obtenues à partir d'une électrophorèse dans des conditions natives (Davis). En B et C, l'électrophorèse a été faite respectivement sans et avec 2-ME. Le puits 1 a été incubé avec un sérum témoin anti-Ro(SS-A). Les puits 2 et 4 avec un sérum non-blotteur. Le puits 3 a été incubé avec un sérum anti-U₁RNP/Sm. Le puits 5 avec un témoin anti-La(SS-B). Le puits 6 avec un sérum normal humain et le puits 7 a été incubé avec un sérum anti-La qui apparaît être monospécifique dans les immunoblots contenant soit un extrait de rate natif ou dénaturé. Ceci est en contraste avec le sérum de référence anti-La (puits 5) qui contient quelques traces d'activité anti-Ro.



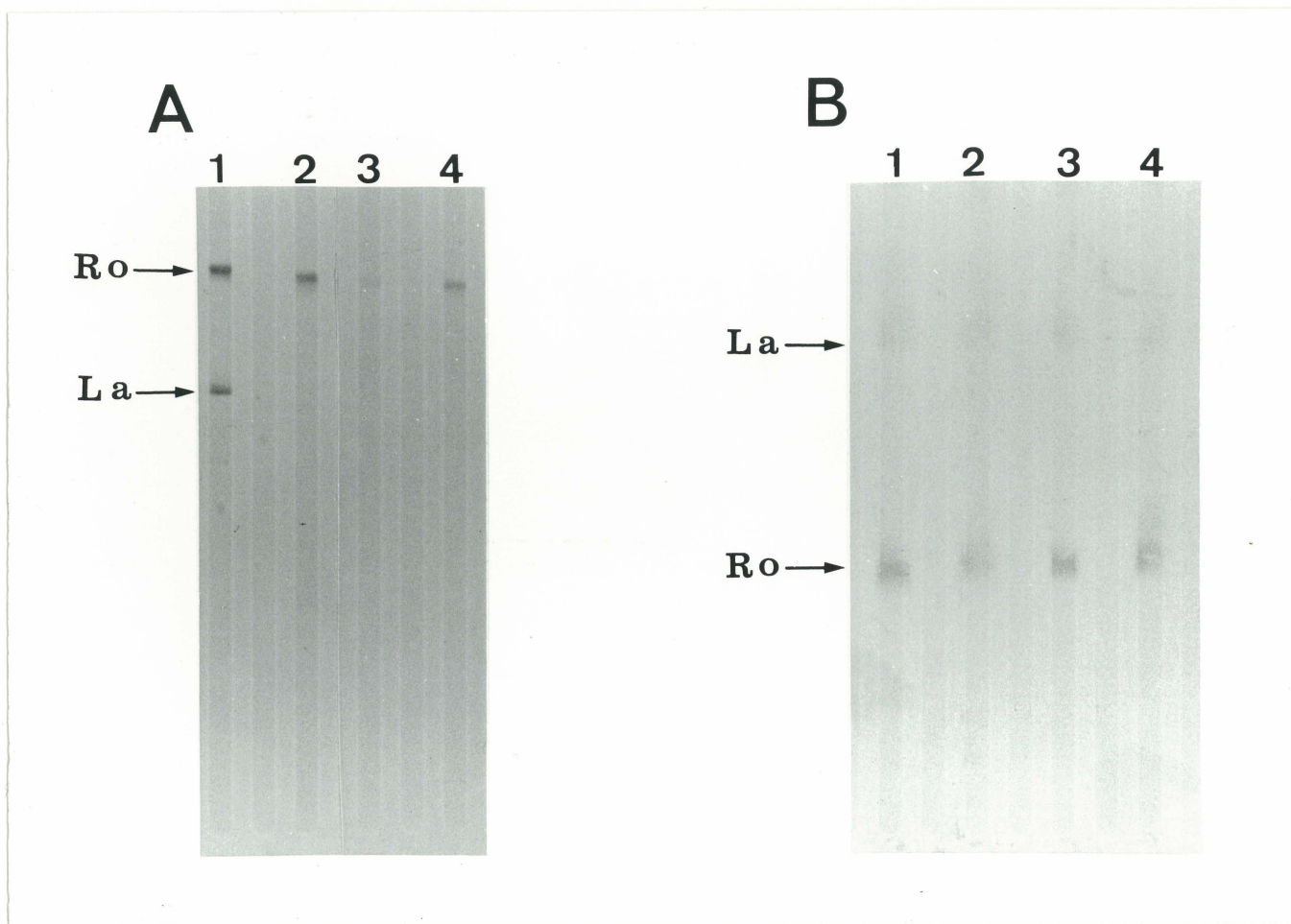
3.4 Quelques sérums anti-Ro(SS-A) reconnaissent un déterminant antigénique présent seulement sur la protéine native Ro(SS-A) de 60 kD

Pour démontrer que les sérums anti-Ro, qui sont facilement détectables par IB dénaturant contiennent les deux spécificités d'anticorps anti-Ro, nous avons épuisé quatre sérums anti-Ro de leurs anticorps reconnaissant le polypeptide Ro 60 kD dénaturé (fig. 10). Après épuisement total (fig. 10A, puits 3), ces sérums reconnaissent encore l'antigène Ro(SS-A) en gel natif. Comme contrôle, pour démontrer la spécificité de l'absorption de l'anticorps anti-Ro dénaturé, on a épuisé un sérum anti-Ro avec les protéine d'une bande d'immunoblot non reliée à l'antigène Ro(SS-A). Dans ce cas, le sérum a révélé l'antigène Ro(SS-A), avec une intensité équivalente à celle du sérum initial non épuisé (fig. 10B, puits 4).

3.5 Hétérogénéité du Ro(SS-A)

Pour explorer s'il pouvait y avoir une certaine hétérogénéité de la protéine Ro(SS-A), on a essayé de séparer l'extrait natif de placenta humain par électrophorèse d'isofocalisation à l'aide de l'appareil Rotofor (LKB). Cette méthode permet d'enrichir environ 25 fois l'échantillon de départ. De plus, la protéine est

Figure 10: Les sérums anti-Ro contiennent deux populations d'anticorps anti-Ro. En A, sont illustrés des immunoblots obtenus à partir d'une électrophorèse en condition dénaturante. En B, les conditions sont natives. Il s'agit d'une expérience typique avec un sérum anti-Ro de titre élevé. Le puits 1 a été incubé avec un sérum témoin anti-Ro et anti-La afin de localiser les bandes de Ro(SS-A) et de La(SS-B). L'immunoréaction des puits 2, 3 et 4 a été réalisée à partir du même sérum anti-Ro, soumis à des traitements différents. Le puits 2 a été révélé avec le sérum anti-Ro non traité. Le puits 3 a été révélé avec le sérum anti-Ro non traité dont on a épuisé les anticorps reconnaissant Ro(SS-A) dénaturé par adsorption spécifique sur la bande de Ro d'un immunoblot d'extrait de rate humaine dénaturée. Le puits 4 a été révélé avec le sérum anti-Ro, traité par adsorption non spécifique sur des protéines extérieures à la bande Ro d'un immunoblot d'extrait de rate humaine dénaturée.

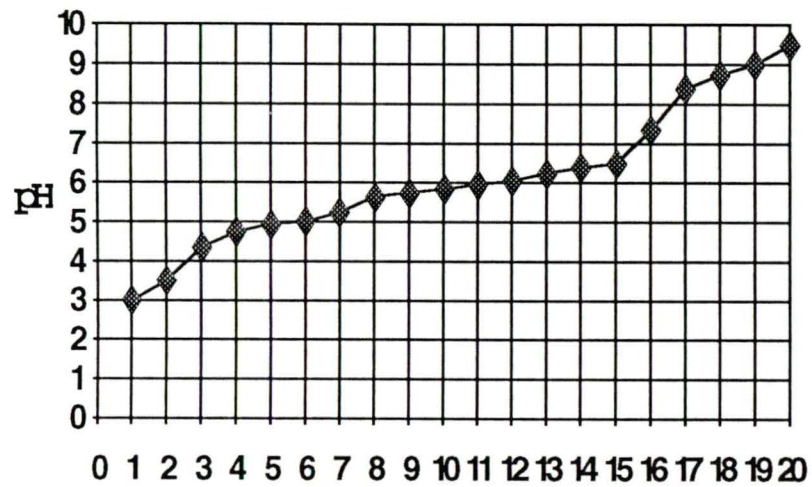


purifiée à l'état natif. Les expériences qui seront décrites sont des expériences strictement préliminaires et devront être répétées dans des conditions techniques optimisées. Le premier fractionnement a été effectué avec un gradient de pH de 3 à 10 et on a identifié (dot blot) la présence des antigènes Ro(SS-A) et La(SS-B) dans les tubes 2 à 7, qui correspondent aux pI 3.5 à 5.5 (tableau 5A). La localisation des protéines Ro(SS-A) et La(SS-B) dans une région de pH acide confirme les pI rapportés pour ces protéines (Elkon, 1984). Pour explorer de façon plus fine la micro-hétérogénéité du système, nous avons refocalisé les fractions contenant le Ro(SS-A) en utilisant un gradient de pH étalé de 3,5 à 5,5 (tableau 5B). Vingt fractions ont été obtenues dans lesquelles on a mesuré le pI et vérifié la présence des antigènes Ro(SS-A) et La(SS-B) par IB Laemmli (fig. 11 et tableau 5B). On a constaté une forte concentration de l'antigène Ro(SS-A) dans les tubes 2 à 10 (fig. 11A et tableau 5B) qui correspondent à l'intervalle de pH 3,5-4 (tableau 5B) et dans les tubes 11, 12 et 13 qui correspondent à l'intervalle de pH 4,15 à 4,3 (fig. 11B, tableau 5B). La concentration de l'antigène Ro(SS-A) estimée quantitativement par l'intensité de la révélation semble plus faible dans les tubes 16 et 17 (fig. 11B) de pH 5 à 5,3 (tableau 5B). De façon très intéressante, on observe la présence de l'antigène La(SS-B) seulement dans les tubes 2, à 10 (fig. 11A) de pH 3,5 à 6 (tableau 5B). Le tout vient corroborer les expériences d'immunoblot natif

(fig. 9) qui suggèrent l'existence d'un Ro isolé et celle d'un Ro associé avec le La.

Tableau 5: Fractionnement par isoélectrofocalisation d'un extrait de placenta humain. En A, une focalisation d'un extrait protéinique (0,46 mg/ml) pour un intervalle de pH de 3 à 10. En B, les fractions 2 à 7 de A contenant les antigènes Ro et La ont été refocalisées pour un intervalle de pH de 3 à 6. L'analyse semi-quantitative du contenu antigénique en Ro et La est obtenue par immunoblot. Une meilleure séparation de protéines est obtenue lors du refractionnement.

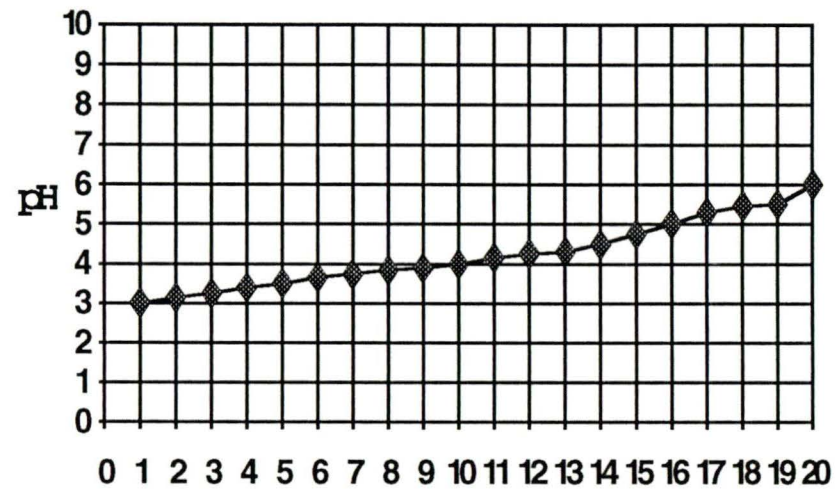
1er fractionnement



Nombre de fractions

Tube	pH	Tube	pH
1	3.00	11	5.95
2	3.50	12	6.05
3	4.35	13	6.25
4	4.75	14	6.40
5	4.95	15	6.50
6	5.00	16	7.35
7	5.25	17	8.40
8	5.65	18	8.75
9	5.75	19	9.00
10	5.85	20	9.50

2e fractionnement

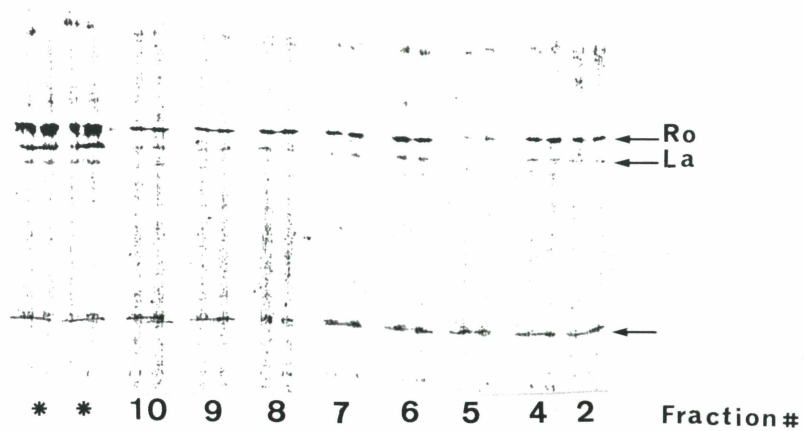


Nombre de fractions

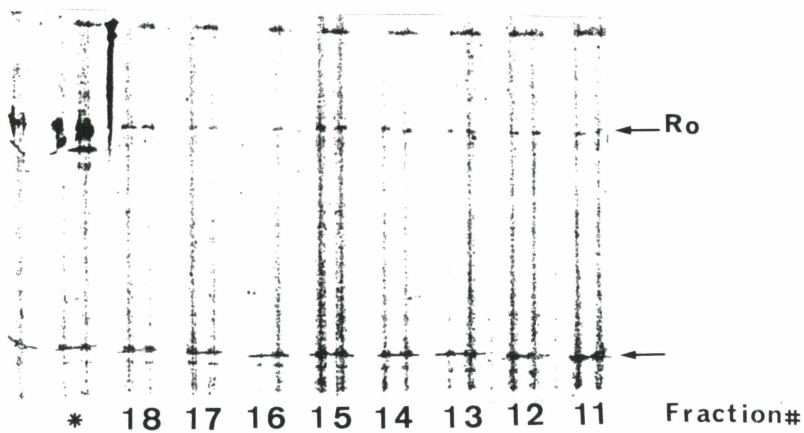
Tube	pH	Tube	pH
1	3.00	11	4.15
2	3.15	12	4.25
3	3.25	13	4.30
4	3.40	14	4.50
5	3.50	15	4.75
6	3.65	16	5.00
7	3.75	17	5.30
8	3.85	18	5.45
9	3.90	19	5.50
10	4.00	20	6.00

Figure 11: Hétérogénéité de l'antigène Ro(SS-A) natif dans un extrait de placenta humain. Analyse par immunoblot de gel dénaturant de fractions provenant d'une électrophorèse isoélectrique de pH 3,0 à 6,00 sur l'appareil Rotofor. Une première séparation avait éliminé les protéines situées à un pI inférieur à 3 et supérieur à 6 (tableau 5A). Les blots ont été incubés avec un anti-sérum contenant un haut titre anti-Ro et anti-La. Un extrait total de placenta (*) est utilisé comme témoin pour comparer l'intensité de la révélation par la peroxidase. La flèche en bas des figures indique le front de migration de la pyronine. On observe une forte concentration de l'antigène Ro(SS-A) dans les fractions 2 à 10 et une faible concentration dans les tubes 11 à 18. On observe aussi la présence de l'antigène La(SS-B) uniquement dans les fractions 2 à 10.

A



B



4. DISCUSSION

Nous avons observé que 90% des sérums anti-Ro(SS-A) positifs par la technique d'immunodiffusion double reconnaissent une seule bande de protéine d'environ 60 kD par la technique d'immunoblot. En utilisant un extrait de rate humaine comme source d'antigène, la technique d'immunoblot apparaît non seulement plus spécifique mais aussi plus sensible (100 à 300 fois) que la technique d'immunodiffusion double qui détecte les sérums contenant les anticorps anti-Ro(SS-A) et anti-La(SS-B) (fig. 5). Cependant malgré cette sensibilité, trois sérums anti-Ro(SS-A) qui forment une forte ligne de précipitation d'identité anti-Ro(SS-A) bien définie, contre un extrait de rate humaine en gel d'agarose, ne réussissent pas à reconnaître le polypeptide Ro(SS-A) dénaturé, présent sur une feuille de nitrocellulose contenant le même extrait de rate humaine (fig. 6). De plus, ces sérums ne réunissent pas à reconnaître le polypeptide Ro(SS-A) de 60 kD dénaturé, purifié par affinité à partir du placenta humain.

Dans les conditions de nos expériences, nous n'avons pu mettre en évidence qu'une bande antigénique Ro(SS-A) de 60 kD. D'autres bandes ont été rapportées dans la littérature: une composante de 52 kD (Elkon et al, 1984; Ben-Chetrit et al, 1988) et une composante de 54 kD (Rader et al, 1989). Aucun de nos sérums anti-Ro(SS-A) n'immunoprécipite des protéines de 52 et 54 kD, que ce soit

à partir d'extrait de cellules HeLa marquées au ^{35}S ou d'extrait de rate humaine. Puisque nous utilisons le même extrait de rate humaine pour effectuer des essais d'immunodiffusion et d'immunoblot en conditions native ou dénaturante et puisque les sérums sont concordants en immunoblots natifs mais discordants en immunoblots dénaturés, il est improbable que les sérums anti-Ro dits "non blotteurs" reconnaissent un composant Ro(SS-A) autre que celui du polypeptide Ro(SS-A) de 60kD. De façon intéressante, Elkon et al (1984) ont rapporté que 2 sérums sur 12 ne reconnaissent pas dans les immunoblots dénaturés les polypeptides de 60 ou 52 kD. De la même manière, Ben-Chetrit et al (1988) ont rapporté que 6 sérums sur 42 ne reconnaissent pas ces mêmes polypeptides en immunoblot. Ce qui représente environ 15 % de sérums anti-Ro(SS-A) "non blotteurs". Il est permis de penser que ces sérums possèderaient des propriétés semblables à celles de nos sérums.

Les sérums "non blotteurs" reconnaissent l'antigène Ro(SS-A) de 60 kD dans des essais où la dénaturation de l'antigène est minimale, comme l'immunodiffusion, l'immunoprécipitation d'un extrait de cellules et l'immunoblot en condition native un extrait natif de rate humaine (fig. 8). Cependant ils ne reconnaissent pas le polypeptide Ro(SS-A) de 60 kD à partir de leur propre ligne de précipitation d'une immunodiffusion

précédente, lorsqu'un immunoblot est effectué en condition dénaturante en présence de SDS (fig. 7). Donc, les sérums "non blotteurs" pourraient contenir des anticorps spécifiques pour des déterminants conformationnels antigéniques, sensibles au SDS, présents sur la protéine Ro(SS-A) de 60 kD. Ces déterminants conformationnels sont différents des épitopes constitués par des séquences d'acides aminés et qui sont probablement reconnus par d'autres types d'anticorps.

Cette hypothèse a été testée en vérifiant si les sérums qui sont positifs en IB contiennent les deux spécificités d'anti-Ro(SS-A) : la spécificité du déterminant conformationnel et celle du déterminant primaire. Pour ce faire, des sérums anti-Ro(SS-A) qui sont de bons bloteurs, ont été épuisés complètement de leur anticorps liant le polypeptide Ro(SS-A) de 60 kD dénaturé (fig. 10). Les surnageants des sérums adsorbés reconnaissent toujours la protéine Ro(SS-A) native dans les immunoblots. On peut donc affirmer que les anticorps dirigés vers les déterminants conformationnels sont présents dans tous les sérums testés et que la vaste majorité des patients, mais pas tous, synthétisent aussi les anticorps dirigés vers les déterminants primaires exprimés sur le polypeptide Ro(SS-A) dénaturé.

L'analyse par IB non réductrice des lignes de précipitation formées en gel d'agarose par un sérum monospécifique anti-Ro(SS-A) révèle la présence des polypeptides Ro(SS-A) et La(SS-B) (fig. 7) . Une fraction de l'antigène Ro(SS-A) co-migre aussi avec l'antigène La(SS-B) dans les gels effectués en conditions natives contenant l'extrait de rate humaine (fig. 9). Ces observations confirment les données antérieures (Wolin et Steitz, 1984; Eisenberg, 1985; Boire et al, 1989) suggérant que les protéines antigéniques Ro(SS-A) et La(SS-B) sont fortement associées et révélées ensemble par immunoblot en conditions natives. Cette association physique est peut-être causée par une relation fonctionnelle étroite entre les protéines Ro(SS-A) et La(SS-B) (Wolin et Steitz, 1984; Reichlin, 1986). Cette association est probablement due à une interaction protéine-protéine et non à une association avec un ARN commun puisque le complexe est résistant à la RNase et sensible au 2-mercaptoéthanol (fig. 9C). Cependant, il est peu probable que le polypeptide La(SS-B) soit lié au déterminant conformationnel révélé par les sérums "non bloteurs" parce que dans les blots contenant l'extrait natif de rate humaine, les trois sérums reconnaissent le polypeptide Ro(SS-A) de Rm 0,75 dépourvu de la bande de 50 kD de l'antigène La(SS-B) (fig. 9). Les expériences préliminaires de focalisation isoélectriques tendent aussi à démontrer que le Ro(SS-A) existe en partie associé au La(SS-B). Ceci pourrait expliquer qu'en

focalisation, le pI du La(SS-B) que nous avons trouvé est légèrement inférieur à 3,15-4,00 (tableau 5B, fig. 11A) à celui rapporté (4,2 à 4,8) (Elkon, 1984). Cette explication hypothétique est à rapprocher de l'observation faite à la fig. 9C où la bande de La(SS-B) a une migration différente lorsque l'extrait est traité par le 2-ME.

Ces données suggèrent que la principale réponse humorale autoimmune à l'antigène Ro(SS-A) de 60 kD est dirigée principalement contre les déterminants antigéniques conformationnels. En effet, les anticorps dirigés vers les déterminants conformationnels constituent les composants majeurs de la réponse autoimmune parce qu'ils sont présents dans tous les sérums anti-Ro(SS-A), qu'ils soient blotteurs ou "non blotteurs". De plus, ils reconnaissent des déterminants conformationnels présents dans des extraits cellulaires variés de Ro(SS-A). Ces anticorps qui reconnaissent un déterminant présent sur la protéine Ro(SS-A) de 60 kD, sont associés avec quatre petits ARN, hY1, hY3, hY4 et hY5. Boire et Craft (1989) ont décrit un nouvel autoanticorps qui reconnaît spécifiquement la particule de Ro(SS-A) associé seulement à l'ARN hY5 (particule RohY5). Cet autoanticorps semble aussi lier un déterminant antigénique conformationnel qui est exprimé par le polypeptide Ro(SS-A) de 60 kD. Les anticorps conformationnels que nous avons étudiés apparaissent différents de l'anticorps conformationnel décrit par Boire

et Craft par la nature de l'ARN associé à la particule de Ro(SS-A). Donc l'identification d'anticorps spécifiques anti-RohY5 et d'anticorps non-spécifiques anti-RohY1,hY3,hY4 et hY5 indique que la particule de RohY5 est une cible distincte des autres particules Ro(SS-A) dans le système immunitaire. Nos données s'ajoutent à celles obtenues à partir de systèmes autoanticorps, autoantigènes qui impliquent les histones (Thomas et al, 1984) , la protéine P ribosomique (Elkon et al, 1988), les ribonucléoprotéines Sm-U1RNP (Reeves et al, 1985) , les ribonucléoprotéines Ro(SS-A) et La(SS-B) (Chambers et al, 1988). Tous ces résultats suggèrent fortement que la formation d'autoanticorps est provoquée par une stimulation directe avec des antigènes natifs (Hardin, 1986). Les immunogènes, qui dirigeraient la réponse autoimmune in vivo, seraient des particules subcellulaires et non des protéines individuelles. Des sites fonctionnels, donc natifs, sur ces particules seraient responsables de la stimulation directe de la production de ces autoanticorps (Tan, 1989). Les mécanismes qui rendent ces protéines antigéniques hautement conservées ne sont pas connus. Des données préliminaires suggèrent que les autoanticorps seraient dirigés vers les épitopes les moins conservés sur le plan phylogénique mais dans des particules globalement très conservées (Boire et Craft, 1989). Ces données pourraient être compatibles avec les modèles autoimmuns expérimentaux où la plupart des anticorps générés par immunisation avec des protéines

natives ont comme cibles des déterminants antigéniques non conservés présents sur la surface des protéines natives.

L'isofocalisation, nous a permis de conclure à l'hétérogénéité de la protéine Ro(SS-A) qui n'est pas focalisée à un pI précis mais plutôt se répartit sur une zone de pH allant de 3.5 à 5.5. La protéine La(SS-B) se distribue dans une zone de pH qui chevauche celle de l'antigène Ro(SS-A). Ceci nous fait conclure qu'il y a soit plusieurs formes différentes de la protéine Ro de 60 kD, soit différentes protéines ayant des charges différentes. Leur localisation dans une région de pH acide confirme les pI rapportés dans le cas des protéines Ro(SS-A) et La(SS-B) (Elkon et Culhane, 1988).

Dans ce travail, les trois patients qui possèdent des sérums "non blotteurs", présentent à peu près les mêmes caractéristiques cliniques voisines. En effet, les trois patients présentent de façon concomittante les symptômes du LED et de la PR (Ménard et Boire, 1989). La prépondérance dans les sérums de ces patients d'anticorps anti-Ro(SS-A) dirigés vers des déterminants conformationnels plutôt que vers des polypeptides dénaturés semble être une caractéristique de cette classe clinique inhabituelle (Ménard et al, 1989). Il reste à déterminer l'importance clinique de ces anticorps en étudiant un groupe de patients plus nombreux. Nos données suggèrent que l'identification d'autoanticorps dirigés contre des antigènes natifs

spécifiques constitue une approche informative des caractéristiques cliniques et biologiques de la réponse autoimmune.

Les connaissances générales de la réponse humorale dans les maladies autoimmunes sont basées sur l'étude des réactions autoantigènes-autoanticorps. Les nouvelles contributions cellulaires et moléculaires sur l'autoimmunité permettront de répondre à certaines questions sur les antigènes Ro(SS-A) jusqu'à maintenant non résolues. Parmi celles-ci, il faudrait déterminer ce qui déclenche l'autoimmunité à l'antigène Ro(SS-A). Est-elle due à la présence d'agent exogène (virus) par exemple, ou à des anomalies immuno-génétiques primaires? Est-ce que les autoanticorps qui sont dirigés contre les antigènes natifs et dénaturés ont une cible intracellulaire ou extracellulaire, cytoplasmique ou nucléaire? Il serait aussi intéressant d'élucider le rôle des autoanticorps dans la physiopathogénèse des maladies autoimmunes. Selon Tan (1989), l'effet pathogène serait dû à la présence de complexes immuns extracellulaires et non à l'inhibition de fonctions cellulaires essentielles (telles la réplication et la transcription d'ADN, l'épissage et la traduction du mRNA) qui sont assurées par les particules sub-cellulaires contre lesquelles les anticorps sont dirigés. Mais cette hypothèse ne pourra être résolue tant que l'on ne connaîtra pas la fonction de l'antigène Ro(SS-A).

5. CONCLUSION

Les anticorps anti-Ro(SS-A) ont été classiquement définis par la technique d'immunodiffusion double en gel d'agarose. Une nouvelle technique plus sensible et plus spécifique a été utilisée lors de ce travail, pour la détection de ces mêmes anticorps, soit la technique d'immunoblot. Par cette technique, nous avons identifié certains sérums qui reconnaissent la protéine de 60 kD en condition native, mais qui ne reconnaissent pas ce même polypeptide en condition dénaturée. Ceci nous a permis de conclure que la majorité des sérums anti-Ro(SS-A) contiennent au moins deux populations d'anticorps: une population qui reconnaît spécifiquement un déterminant présent seulement sur la protéine Ro(SS-A) native et une autre, la population classique d'anticorps anti-Ro(SS-A), qui reconnaît de façon prédominante les épitopes primaires. Les travaux présentés dans ce mémoire appuient donc le concept que la synthèse d'autoanticorps est provoquée par une stimulation directe par des antigènes natifs.

6. REMERCIEMENTS

Je désire transmettre ma plus grande reconnaissance à mes directeurs de travaux qui ont su m'accorder leur confiance. J'aimerais ainsi remercier particulièrement:

Dr. Henri-André Ménard, qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a permis de réaliser mon projet de maîtrise.

Dr. Eveline de Médecis pour son jugement critique et son aide précieuse durant la rédaction de ce mémoire.

Dr. David Gibson.

Je remercie également Dr. Gilles Boire dont les judicieux conseils ont porté fruits.

Je remercie aussi tous les membres du département de rhumatologie:

Les techniciennes Maryse Gendron, Hélène Labonville et Carole Richard pour leur cordialité et leur gentillesse.

La secrétaire Marthe Fillion pour son aide technique sur la présentation de ce mémoire.

Finalement, je remercie mes parents et mon ami Roger pour leur soutien moral tout au long de ma maîtrise.

RÉFÉRENCES

- ALSPAUGH, M., and TAN, EM. (1975) Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. J. Clin. Invest. 55; 1067-1075.
- ALSPAUGH, M., and TAN, EM. (1976) Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's Syndrome. Arth. Rheum. 19; 216-222.
- ALSPAUGH, M., and MADDISON, P. (1979) Resolution of the identity of certain antigen- antibody in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an interlaboratory collaboration. Arth. Rheum. 22; 796-798.
- BABBITT, B.P., ALLEN, P.M., MATSUEDA, G., HABER, E., and UNANUE, E.R. (1985) Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. Nature. 317; 359-361.
- BACH, J.F., and LESAVRE, P. (1982) Immunologie, Flammarion médecine sciences, Paris, France, p.185.

BACHMANN, M., MAYET, W.J., SCHRODER, C.H., PFEIFER, K., MEYER, K.H., BUSCHENFELDE, M.Z., and MULLER, W.E.G. (1986) Association of La and Ro antigens with intracellular structures in Hep-2 carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 7770-7774.

BACHMANN, M., MAYET, W.J., SCHRODER, C.H., PFEIFER, K., MEYER, K.H., BUSCHENFELDE, M.Z., and MULLER, W.E.G. (1987) Identification of the Ro and La antigens in the endoribonuclease VII ribonucleoprotein complex. J. Biochem. 243; 189-194.

BEN-CHETRIT, E., CHAN, E.K.L., SULLIVAN, K.F, and TAN, E.M. (1988) A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particule. J. Exp. Med. 167; 1560-1571.

BEN-CHETRIT, E., GANDY, B.J., TAN, E.M., and SULLIVAN, K.F. (1989) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60Kd component of the human SS-A Ro RNP auto Ag. J.C.I. 83;1284-1292.

BEREK, C., and MILSTEIN, C. (1987) Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. Immunol. Rev. 96; 23-41.

- BERG, J.M. (1986) Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* 232; 485-487.
- BJORKMAN, P.J., SAPER, M.A., SAMRAOUI, B., and BENNETT, W.S. (1987) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329; 512-521.
- BOIRE, G., and CRAFT, J. (1989) Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles: Analysis with sera specific for the Ro^{hY5} particle. *J. Clin. Invest.* 84; 270-279.
- BOIRE, G., HARDIN J.A., and CRAFT, J. (1989) Biochemical heterogeneity of the Ro particles. (abstr.) *Arth. Rheum.* 32; (supplement: 32:R6)
- BROWN, J.H., JARDETZKY, T., SAPER, M.A., SAMRAOUI, B., BJORKMAN, J., and WILEY, D.C. (1988) A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332; 845-850.
- BUSS, S., COLON, S., SMITH, C., FREED, J.H., MILES, C., and GREY, H.M. (1986) Interaction between a "processed" ovalbumin peptide and Ia molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83; 3968-3971.

- BUYON, J.P., and ZUCKERMAN, J.D. (1987) Articular manifestations of systemic lupus erythematosus, Systemic Lupus Erythematosus. Edited by R.G. Lahita. N.Y. John Wiley and Sons. p. 791-820.
- CHAMBERS, C.J., and KEENE, J.D. (1985) Isolation and analysis of cDNA clones expressing human lupus La antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82; 2115-2119.
- CHAMBERS, C.J., KENAN, D., MARTIN, B.J., and KEENE, J.D. (1988) Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La(SS-B) autoantigen. J. Biol. Chem. 263; 18043-18051.
- CHILLER, J.M., HABICHT, G.S., and WEIGLE, W.O. (1970) Cellular sites of immunologic unresponsiveness. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65; 551.
- CLAMAN, H.N., CHAPERON, E.A., and TRIPLETT, R.F. (1966) Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122; 1167-1171.
- CLARK, G., REICHLIN, M., and TOMASI, T.B. (1969) Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. J. Immunol. 102; 117-122.

- DAVIS, B.J. (1964) Disc Electrophoresis- II: Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121; 404-427.
- DENG, J.S., SONTHEIMER, R.D., and GILLIAM, J.N. (1984) Molecular characteristics of La(SS-B) and Ro(SS-A) cellular antigens. J. Invest. Derm. 84; 86-90.
- DEUTSCHER, S.L., HARLEY, J.B., and KEENE, J.D. (1988) Molecular analysis of the 60-kD human Ro ribonucleoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 9479-9483.
- EISENBERG, R.A. (1985) Association between the Ro and La antigenic determinants: immunodiffusion analysis of human spleen extract. J. Immunol. 135; 1701-1713.
- ELKON, K.B., and CULHANE, L. (1984) Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. J. Immunol. 132; 2350-2356.
- ELKON, K.B., BONFA, E., LLOVET, R., DANHO, W., WEISSBACH, H., and BROT, N. (1988) Properties of the ribosomal P2 protein autoantigen are similar to those of foreign protein antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 5186-5189.

FRANKEL, A.D., and PABO, C. (1988) Fingering too many proteins. CELL 53; 675.

HARDIN, J.A., and MIMORI, T. (1985) Autoantibodies to ribonucleoproteins. Clin. Rheum. Dis. 11; 485-505.

HARDIN, J.A. (1986) The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arth. Rheum. 29; 457-460.

HARMON, C.E., DENG, J.S., PEEBLES, C.L., and TAN, E.M.
(1984) The importance of tissue substrate in the SS-A(Ro) antigen-antibody system. Arth. and Rheum. 27; 166-173.

HEDRICK, S.M., COHEN, D.I., NIELSEN, E.A., and DAVIS, M.M.
(1984) Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane associated proteins. Nature 308; 149-153.

HENDRICK, J.P., WOLIN, S.L., RINKE, J., LEARNER, M.R., and STEITZ, J.A. (1981) Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. Mol. Cell Biol. 1; 1138-1149.

- HOZUMI, G., and TONEGAWA, S. (1976) Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73; 3628-3632.
- KAHN, M.F., and PELTIER, A.P. *Maladies dites systémiques*, Flammarion médecine sciences, Paris, France (1982), p. 68-69.
- KATO, N. HOSINO, H., and HARADA F. (1982) Nucleotide sequence of 4.5 S RNA (C8 or hY5) from Hela cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108; 363-370
- KATZ, D.H. (1978) Self-recognition is a mean of cell communication in the immune system. *Cell-cell recognition*. Curtis, A.S.G. editor. Cambridge University Press. N-Y. p 411-427.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature*. 227; 680-685.
- LERNER, R.M., and STEITZ, A.J. (1981) Snurps and Scyrps. *Cell* 25; 298-300.

- LIEU, T.S., JIANG, M., STEIGERWALD, J.C., and TAN, E.M.
(1984) Identification of the Ro(SS-A) intracellular antigen with autoimmune sera. *J. Immunol. Methods* 71; 217-228.
- LIEU, T.S., NEWKIRK, M.M., CAPRA, D.J., and SONTHEIMER, R.D.
(1988) Molecular characterization of human Ro(SS-A) antigen: Amino terminal sequence of the protein moiety of human Ro(SS-A) antigen and immunological activity of a corresponding synthetic peptide. *J. Clin. Invest.* 82; 96-101.
- MACKAY, I.R., FRAZER, I.H., MCNEILLAGE, L.J., and WITTINGHAM, S. (1986) Auto-epitopes and autoimmune diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 475; 59-65.
- MÉNARD, H.A., BOIRE, G., LOPEZ-LONGO, F.J., MASSON, C., and LAPOINTE, S. (1989) Lupus and RA subset predicted and defined by the presence of anti-native Ro(SS-A) antibody. (abstr.) *Arth. Rheum.* 32 (supplement: R9).
- MILLER, J., MCLACHLAN, A.D., and KLUG, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor III a from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4; 1609-1614.

NOSSAL, G.J.V., and LEDERBERG, J. (1958) Antibody production by single cells. *Nature* 181; 1419-1420.

NOSSAL, G.J.V., CUNNINGHAM, A., MITCHELL, G.F., and MILLER J.F.A.P. (1968) Cell to cell interaction in the immune response. *J. Exp. Med.* 128; 839-850.

NOSSAL, G.J.V. (1983) Cellular mechanisms of immunologic tolerance. *Ann. Rev. Immunol.* 1; 33-66.

NOSSAL, G.J.F. (1988) Cellular mechanisms in B lymphocyte activation and tolerance. *J. Immunol.* 141; S-21-S-24.

NOSSAL, G.J.F. (1989) Immunologic tolerance: Collaboration between antigen and lymphokines. *Science* 245; 147-153.

O'BRIEN, W.H., and BAGBY, G.F. (1988) Rare adverse reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Rheum.* 12; 13-20, 347-353, 562-567, 785-790.

OUCHTERLONY, O. (1949) Antigen-antibody. Reactions in gels. *ACTA. Pathol. Microbiol. Scand.* 26; 507-515.

RADOUX, V., MÉNARD, H.A., BÉGIN, R., DÉCARY, F., and KOOMAN, W.J. (1987) Airways disease in rheumatoid arthritis patients, one element of general exocrine dysfunction. *Arth. Rheum.* 3; 249-256.

RADER, M.D., O'BRIEN, C., LIU, Y., HARLEY, J.B., and REICHLIN, M. (1989) Heterogeneity of the Ro(SS-A) antigen. Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J. Clin. Invest.* 83; 1293-1298.

RAJEWSKY, K., FORSTER, I., and CUMANO, A. (1987) Evolutionary and somatic selections of the antibody repertoire in the mouse. *Science* 238; 1088-1094.

REEVES, W.H., FISHER, D.E., LAHITA, R.G., and KUNKEL, H.G. (1985) Autoimmune sera reactive with Sm antigen contain high levels of RNP-like antibodies. *J. Clin. Invest.* 75; 580-587.

REICHLIN, M. (1986) Significance of the Ro antigen system. *J. Clin. Immunol.* 6; 339-348.

RINKE, J., and STEITZ, J.A. (1982) Precursor molecules of both human 5S ribosomal. *Cell.* 29; 149.

ROITT, I., BROSTOFF, J., and MALE, D. Immunologie fondamentale et appliquée. Médecine et Sciences Internationales, Paris (1985) , p.12.11

ROSA, M.D., GOTTLIEB, E., LERNER, M.R., and STEITZ, J.A. (1981) Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. Mol. and Cell. biol. 1; 785-796.

SAMTER, M., WEIGLE, W.O. (1978) Immunological Diseases. Third edition. Samter, M. editor. Talmage D.W., et al section editors. Little, Brown and Compagny, Boston p. 389-407.

SANDERS, V.M., SNYDER, J.M., UHR, J.W., and VITTEEA, E.S. (1986) Characterization of the physical interaction between anti-specific B and T cells. J. Immunol. 137; 2345-2404.

SCHUMACHER, H.R., KLIPPEL, J.H., and DWIGHT, R.R. (1988) Primer on the rheumatic diseases. Published by the Arthritis foundation, Atlanta GA. p. 96-100

SCOPELITIS, E., BIUNDO, J.J., and ALSPAUGH, M.A. (1980) Anti-SS-A antibody and other antinuclear antibodies in systemic erythematosus. Arth. Rheum. 23; 287-293.

SMITH, H.R., AND STEINBERG, A.D. (1983) Autoimmunity - A perspective. *Ann. Rev. Immunol.* 1; 175-210.

STEITZ, J.A., WOLIN, S.L., RINKE, J., PETTERSSON, I., MOUNT, S.M. (1982) Small ribonucleoproteins from Eukaryotes: structures and roles in RNA biogenesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47;893-900.

STAUB, C. (1987) Theoretical and practical aspects of B-cell activation: Murine and human systems. *Immunol. Rev.* 99; 281-299.

STURGESS, A.D., PETERSON, G.M., MCNEILAGE, J., WHITTINGHAM, S., and COPPEL, L.R. (1988) Characteristics and epitope mapping of a cloned human autoantigen La. *J. Immunol.* 145; 3212-3218.

TAN, E.M. (1989) Interaction between autoimmunity and molecular and cell biology. *J. Clin. Invest.* 84; 1-6.

- THEOFILOPOULOS, A.N. (1987) Autoimmunity. Basic and clinical immunology, Stites, D.P., Stobo, J.D., and Wells, J.V. (Edited by). 6th Edition, Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut, Los Altos, California, 94022 (Lange Medical Publications), Chap. 11, Autoimmunity, Argyrios N., Theofilopoulos, 777 pages, (1987) p.128-158.
- THOMAS, J.O., WILSON, C.M., and HARDIN, J.A. (1984) The major core histone antigenic determinants in systemic lupus erythematosus are in the trypsin-sensitive regions. FEBS Letts. 169; 90-96.
- WEIGLE, W.O. (1971) Recent observations and concepts in immunological unresponsiveness and autoimmunity. Clin. Exp. Immunol. 9; 437-447.
- WOLIN, S.L., and STEITZ, J.A. (1983) Genes for two small cytoplasmic Ro RNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. Cell 32; 735-744.
- WOLIN, S.L., and STEITZ, J.A. (1984) The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins : identification of the antigenic proteins and its binding site on the RoRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81; 1996-2000.

YAMAGATA, H., HARLEY, J.B., and REICHLIN, M. (1984) Molecular properties of the Ro(SS-A) antigen and enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation. J. Clin. Invest. 74; 625-633.

YANAGI, Y., YOSHIKAI, Y., LESSETT, K., CLARK, S.P., ALEKSANDER, I., and MAK, T.W. (1984) A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. Nature 308; 145-149.

ZUBLER, R.H., WERNER-FAVRE, C., WEN, L., SEKITA, K.I., and STRAUB, C. (1987) Theoretical and practical aspects of B-cell activation: Murine and human systems. Immunol. Rev. 99; 281-299.

ANNEXE I**MATERIEL**

Acétate d'ammonium: Fisher Scientific Compagny, USA

Acétate de sodium: J.T. Baker Chemical Co. USA

Acide acétique: BDH Chemicals LTD, Toronto and Branches

Acrylamide: Bio-Rad Laboratories, Richmond

Agarose: Bio-Rad Laboratories, Richmond

Anti-IgG humain marqué à la peroxydase: Jackson(Ontario)
Immuno Research Laboratories

Azoture de sodium: Fisher Scientific Compagny, USA

Bleu de coomassie R-250: Sigma Chemicals Compagny, USA

Bis: Bio-Rad Laboratories, Richmond

Cellulose Diéthylaminoéthyl: Whatman Bio Systems LTD,
England

4-Chloro-1-Napthol: Aldrich Chemical Compagny, Milwaukee

Chlorure de magnésium: Fisher Scientific Compagny, USA

Chlorure de sodium: BDH Chemicals LTD, Toronto and Branches

Dodécylsulfate de sodium: Fisher Scientific Compagny, USA

Dithiothréitol: Sigma Chemical Compagny, USA

Ethanol: Les alcools Consolides Limitée, Ontario

Extrait commercial de thymus de lapin: Rel Freeze

Film XRP: Kodak, N.Y.

Fluorure de phényl, méthyl, sulfonyl: Sigma Chemical
Compagny, USA

Glycérol: Fisher Scientific Compagny, USA

Glycine: Sigma Chemical Compagny, USA

8-Hydroxyquinoline: Aldrich Chemicals Compagny

2-Mercaptoéthanol: Calbiochem, Californie

Méthanol: Anachemia

Méthionine -[³⁵S]: Amersham

Nitrocellulose: Amersham, 0.45 Micron Hybond-C

Nonidet P-40: Particle Data Laboratories LTD

Peroxydase: Fisher Scientific Compagny, USA

Pénicilline: Sigma Chemical Compagny, USA

Phosphate -[³²P]: Amersham

Phosphate de sodium monobasic: Fisher Scientific Compagny, USA

Phosphate de sodium dibasique: Fisher Scientific Compagny, USA

Polyéthylène glycol: Fisher Scientific Compagny, USA

Protéine-A Sépharose CL-4B: Pharmacia, Sweden

Réactifs utilisés pour le test de Bradford: Bio-Rad Laboratories

Ribonucléase A pancréatique: Boehring Mannheim

RPMI 1640: Sigma Chemical Compagny, USA

Sérum albumine bovine: Sigma Chemical Compagny, USA

Sérum veau fétal: Flow Laboratories, Virginie

Sulfate d'ammonium: Fisher Scientific Compagny, USA

Streptomycine: Sigma Chemical Compagny, USA

t RNA de levure:

Tris: Boehringer Mannheim Biochemicals, USA

Tween-20: Sigma Chemical Compagny, USA

Urée: Sigma Chemical Compagny, USA

ANNEXE II

Critères révisés et proposés par le Collège américain de rhumatologie (1987) pour la classification de l'arthrite rhumatoïde.

A. Arthrite rhumatoïde classique

Le diagnostic d'arthrite rhumatoïde exige la présence d'au moins 4 de ces critères.

1. Raideurs matinales durant au moins une heure par jour et pour une période minimale de 6 semaines.
2. Gonflement d'au moins trois articulations pour une période minimale de 6 semaines.
3. Gonflement du poignet, des articulations métacarpophalangiennes ou interphalangiennes proximales pour au moins 6 semaines.
4. Gonflement symétrique des articulations.
5. Changements roentgenographiques typiques de l'arthrite rhumatoïde devant inclure des érosions et une décalcification osseuse.

6. Nodules rhumatoïdes.

Présence de :

7. Facteur rhumatoïde sérique par une méthode ne détectant que 5% de cas positifs chez les individus normaux.

Critères révisés pour la classification du SLE (1982)

1. Eruption faciale :

Erythème fixe, plat ou surélevé, au-dessus des éminences malaires avec tendance à épargner les replis nasolabiaux.

2. Eruption discoïdale:

Plaques érythémateuses surélevées avec escalade kératotique adhérente et obstruction folliculaire; la cicatrisation atrophique peut se produire dans les lésions moins récentes.

3. Photosensibilité:

Eruption cutanée consécutive à une réaction anormale à la lumière du jour, diagnostiquée d'après l'histoire du patient ou l'observation du médecin.

4. Ulcères oraux:

Ulcération buccale ou nasopharyngée, habituellement indolore, observée par un médecin.

5. Arthrite:

Arthrite non-érosive impliquant 2 ou plusieurs articulations périphériques, caractérisée par de la sensibilité, des gonflements ou des épanchements.

6. Sérosite:

a) Pleurésie, histoire convaincante de douleurs pleurétiques ou frottements entendus par le médecin ou évidence d'épanchement pleural.

ou

b) Péricardite, détectée par électrocardiogramme (ECG) ou friction ou évidence d'épanchement péricardique.

7. Désordres rénaux:

a) Protéinurie persistante supérieure à 0.5 g par jour ou à + 3 si la quantification n'est pas effectuée.

ou

b) Présence de cellules dans l'urine - globules rouges, hémoglobine, cellules granulaires, tubulaires ou mélangées.

8. Désordres neurologiques:

a) Anxiété en absence de drogues inductrices ou dérangements métaboliques connus. Ex.: urémie, cétoacidose ou déséquilibre électrolytique.

ou

b) Psychose: en absence de drogues inductrices ou dérangements métaboliques connus. Ex.: urémie, cétoacidose ou déséquilibre électrolytique.

9. Désordres hématologiques:

a) Anémie hémolytique avec réticulocytose.

ou

b) Leucopénie moins que $4000/\text{mm}^3$ à 2 ou plusieurs reprises.

ou

c) Lymphopénie moins que $1500/\text{mm}^3$ à 2 ou plusieurs reprises.

ou

d) Thrombocytopénie moins que $100\,000/\text{mm}^3$ en absence de drogues inductrices.

10. Désordres immunologiques:

a) Test positif pour la présence des cellules LE.

ou

b) Anti-DNA: anticorps contre le DNA natif à un titre anormal.

ou

c) Anti-Sm: présence d'anticorps contre l'antigène nucléaire Sm.

ou

d) Faux positif dans l'examen sérologique pour la syphilis, reconnu comme positif depuis au moins 6 mois et confirmé par le test d'immobilisation de treponema pallidum ou le test d'absorption de l'anticorps treponemal fluorescent.

11. Anticorps antinucléaires:

Un titre anormal d'anticorps antinucléaires déterminé par immunofluorescence ou une analyse équivalente à tout moment et en absence de drogues dont l'association avec le syndrome du lupus induit est reconnue.